

Tesis doctoral

***Identificación y caracterización de dos islas genómicas
implicadas en la resistencia a los antibióticos:
El papel de la transferencia genética
en las bacterias anaerobias***

por

Manuel Rodríguez Alcayna



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología



Servicio de Microbiología



Hospital Ramón y Cajal



**El trabajo recogido en esta Tesis doctoral ha sido realizado en el
Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid,
siendo directores del mismo los Doctores
Fernando Baquero Mochales y Juan Carlos Galán Montemayor**

**Se presenta para la obtención del grado académico de Doctor ante el
Departamento de Biología
Programa de Doctorado en Microbiología
Universidad Autónoma de Madrid**

**El tutor de esta Tesis doctoral por parte de la
Universidad Autónoma de Madrid
fue el
Dr. José Luis Bella Sombria**

Índice

página

Abstract

Resumen

Parte I. Introducción.	1
1. El ecosistema del tracto gastrointestinal humano y la resistencia a los antibióticos.	2
1.1 Resistencia a antimicrobianos: de la ecología a la clínica.	2
1.2 Algunos ejemplos de transferencia de genes de resistencia desde bacterias medioambientales a bacterias patógenas para el hombre.	4
1.3 Ecología del tracto gastrointestinal humano.	5
1.4 La microbiota intestinal humana como reservorio de resistencias a los antibióticos.	9
2. La importancia taxonómica de <i>Acidaminococcus</i> .	12
2.1. El orden <i>Negativicutes</i> . Clase <i>Selenomonadales</i> . Familia <i>Acidaminococaceae</i> .	12
2.2. Significación biológica de los <i>Negativicutes</i> en la evolución.	13
3. Resistencia a los antibióticos en el orden <i>Negativicutes</i> .	15
3.1 Epidemiología.	15
3.2 Resistencia a β -lactámicos. Frecuencia, mecanismos, genes.	16
3.2.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos.	16
3.2.2 Prevalencia en la clase <i>Negativicutes</i> .	19
3.3 Resistencia a tetraciclinas.	19
3.3.1 Mecanismo de acción de las tetraciclinas.	20
3.3.2 Mecanismos de resistencia a tetraciclinas.	21
3.3.3. Prevalencia en la clase <i>Negativicutes</i> .	22
4. Transferencia génica horizontal en bacterias anaerobias.	29
4.1. Elementos móviles en <i>Negativicutes</i> .	36
5. Referencias	38

Parte II. Materiales y métodos.	51
1. Cepas empleadas en este trabajo.	52
2. Métodos de cultivo.	54
2.1 Medios de cultivo.	54
2.2 Condiciones de cultivo.	55
3. Métodos de detección de la resistencia a los antibióticos.	56
3.1 Métodos fenotípicos.	56
3.2 Métodos genotípicos.	56
4. Técnicas de extracción y amplificación del ADN.	57
4.1 Extracción y purificación del ADN.	57
4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): PCR convencional y PCR inversa.	57
5. Análisis bioinformático.	59
6. Técnicas de hibridación.	60
7. Conjugación de <i>Acidaminococcus</i> con <i>Streptococcus</i> : Selección por muerte en aerobiosis.	60
8. Otras técnicas empleadas: Intentos de movilización por mutación causada por irradiación con luz UV.	61
9. Referencias.	63
Objeto de la presente Tesis.	65
Parte III. Resultados.	66
1. Resistencias a los antibióticos encontradas en las cepas en estudio.	67
1.1 Estudio previo del perfil de resistencias.	67
2. Entorno genético de la β -lactamasa ACI-1.	69

2.1.- Entorno genético inmediato a bla _{aci1}	69
2.2 Caracterización del elemento genético portador del gen bla _{aci1} en <i>A.intestini</i> RYC-MR95.	74
2.3.- Estudios de genómica comparada: determinación de las marcas de integración de IG-ACI-1.	86
2.4 Organización genética de IG-ACI-1. Esbozo general de la anotación.	91
2.5 Búsqueda de IG-ACI-1 en las cepas de la colección RYC.	100
2.6 Movilización de IG-ACI-1: inferencia mediante estudios de filogenia.	103
3. Entorno genético del gen <i>tet</i>(32).	110
3.1 Elemento genético portador de <i>tet</i> (32).	110
3.2 Análisis de los diferentes <i>orf</i> del elemento portador de <i>tet</i> (32). Resultados de la anotación.	112
3.3 El elemento portador de <i>tet</i> (32) en las diferentes cepas del estudio y comparación con otras cepas no portadoras en la base de datos.	115
3.4. Experimentos de conjugación con <i>Streptococcus</i> . Movilización.	116
4. Referencias.	118
 Parte IV. Discusión.	 122
 1. Análisis de las estructuras genéticas y el origen del elemento IG-ACI-1.	 123
1.1 Reconstrucción de los posibles eventos de movilización ocurridos para la formación de la estructura genética de IG-ACI-1.	123
1.2 Diseminación del elemento IG-ACI-1.	125
1.3 Mecanismo de movilización de IG-ACI-1. Sistemas de doble recombinasa.	128
 2. El gen <i>tet32</i> se moviliza en un transposón conjugativo.	 130
3. Plasticidad genómica y teoría modular.	133
4. Referencias.	137
Conclusiones.	138
 Parte V: Apéndices	 140
Apéndice A.	141
Apéndice B.	146

Abstract

Genus *Acidaminococcus* is a paradigmatic member of Class *Negativicutes*, a group composed by phenotypically defined Gram (-) (presenting lipopolysaccharide) bacteria but with a genotypic background related to Gram (+) species (as by 16S rRNA patterns). The presence of different antibiotic resistances thought they are non-pathogenic bacteria, allows us to hypothesize with the possibility for that genera to be a node of interaction *via* Horizontal Gene Transfer between different pathogenic and non-pathogenic bacteria, providing them a stable reservoir for genetic resistance determinants, thanks to an evolutionary-driven genomic plasticity process. The present work describes two different kinds of mobile genetic elements within *Acidaminococcus*: the Genetic Islands IG-ACI-1 and IG-ACI-2, carriers of gene *bla_{aci1}*, the first β -lactamase described in anaerobic cocci. It is also described a new conjugative transposon carrying resistance to tetracycline gene *tet*(32), being the first time that a mobile genetic element is described to be carrying this gene. The work here presented permits to assess the relevant role of *Acidaminococcus* into mobilization and evolutionary mechanisms of antibiotic resistance within the microbiota.

Resumen

El estudio del microbioma humano está confirmando la presencia de genes de resistencia a los antibióticos, localizados en diversos tipos de elementos móviles, mayoritariamente plásmidos y elementos integrativos-conjugativos; pero también en una gran diversidad de estructuras móviles complejas poco conocidas aún y difícilmente clasificables llamadas globalmente *islas genéticas*. Profundizar en el estudio del valor biológico de estas estructuras como vectores de los mecanismos de resistencia diseminables por transferencia génica horizontal es el objetivo general de esta Tesis.

El microbioma humano lo forman fundamentalmente bacterias anaerobias obligadas. La Clase *Negativicutes* se están revelando como uno de los grupos más interesantes, puesto que poseen caracteres clave de Gram-negativos (membrana externa LPS) pero características genotípicas de Gram-positivos (16S ARNr y genes *housekeeping*, como *gyrA*, evolutivamente próximos a *Clostridium*). El género *Acidaminococcus* es un miembro de la clase *Negativicutes* que resulta un candidato idóneo para estudiar el potencial diseminador de mecanismos de resistencia en las bacterias que forman el microbioma humano. El estudio de los mecanismos de resistencia a los antibióticos realizado durante esta Tesis en este género, desvela la presencia de varios tipos de genes de resistencia en diversas cepas de las dos especies descritas (*A. fermentans* y *A. intestini*), destacando la resistencia a los antibióticos β -lactámicos y a las tetraciclinas.

Se describen por primera vez dos tipos de elementos movilizables en este organismo: las islas genéticas IG-ACI-1 y su variante IG-ACI-2, portadoras del gen *bla_{aci1}*, la primera β -lactamasa descrita en un coco Gram (-); así como un nuevo transposón conjugativo, que es el primer elemento movilizable descrito portador del gen de resistencia a tetraciclina *tet*(32).

La reconstrucción filogenética basada en PhyML de *orfs* encontrados en las islas genéticas que portan esos determinantes permite inferir la movilización del elemento que porta la β -lactamasa ACI-1 y la identificación de eventos de recombinación en el determinante que porta el gen *tet*(32).

En conjunto, el trabajo de esta Tesis permite por primera vez situar a *Acidaminococcus* como un género relevante en la movilización y evolución de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en la microbiota intestinal.

Parte I

Introducción

1. El ecosistema del tracto gastrointestinal humano y la resistencia a los antibióticos.

1.1 Resistencia a antimicrobianos: de la ecología a la clínica.

Los dos mecanismos que rigen la aparición de las resistencias a los antibióticos son el surgimiento *de novo* por mutación y la adquisición mediante Transferencia Genética Horizontal (TGH) de genes de resistencia previamente existentes (1). Más adelante, hablaremos con más detalle de estos mecanismos.

Sabemos que los microorganismos patógenos humanos eran sensibles a los antibióticos antes de su introducción para el tratamiento de las enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Así pues, aquellos genes de resistencia adquiridos por TGH deben necesariamente proceder de organismos no patógenos que fuesen portadores previamente (2). El origen de los genes de resistencia a los antibióticos en bacterias ambientales no patogénicas, y su consiguiente transferencia hacia organismos patógenos para los seres humanos es un planteamiento generalmente aceptado en la actualidad. Se ha documentado la presencia de estos genes y su transferencia tanto en microorganismos de la flora comensal humana como en la microbiosfera ambiental.

El número estimado de bacterias presentes en los océanos de La Tierra alcanza órdenes de magnitud de 10^{29} , un simple dato que ilustra el potencial del acervo genético del conjunto de la microbiosfera, virtualmente inagotable. Nótese, además, que el grado de conocimiento actual sobre el conjunto de la biosfera microbiana es todavía muy limitado. Resulta, pues, lógico pensar que una proporción mayoritaria de los genes de resistencia o proto genes de resistencia (genes que por si mismos no confieren resistencia antibiótica, pero que sucesivos eventos de mutación y selección post-exposición generarían verdaderos genes de resistencia) se encuentra en los microorganismos ambientales. Es el denominado microbioma medioambiental.

Actualmente se postula que estos genes se habrían diseminado desde microorganismos ambientales hacia organismos comensales humanos, y de ellos hacia los patógenos. Este proceso de transferencia desde el medioambiente al entorno humano es azaroso y, por lo tanto, cuanto más presente esté un mecanismo de resistencia en el medioambiente, mayor la probabilidad de ser transferido. Estos determinantes (o proto-determinantes) de resistencia eran (y posiblemente son) genes con funciones fisiológicas diversas, y cuya evolución hacia la adquisición de una nueva

función (resistencia antibiótica) ha sido favorecida en situaciones de estrés bacteriano que condicionaran su falta de crecimiento (como la presión antibiótica en el entorno hospitalario). Un ejemplo paradigmático son las enzimas PBP (*Penicillin Binding Proteins*), las proteínas implicadas en la construcción del pared bacteriana. La PBP5 de *Escherichia coli* tiene débil actividad β -lactamasa (3). El progresivo aumento de nuestro conocimiento sobre la microbiosfera en su conjunto, merced al avance de las técnicas de secuenciación y análisis bioinformático, aportará datos a medio y largo plazo que permitirán definir más y mejor estos conceptos.

La dinámica de este proceso de transferencia génica está determinada por varios factores limitantes o favorecedores (4):

1. *Del nicho ecológico.* Las bacterias dadora y receptora deben compartir, de manera temporal o estable, un mismo nicho ecológico.

2. *De la situación medioambiental.* El estrés bacteriano mantenido facilita la selección de bacterias con alta tasa de mutación, bacterias mutadoras. Estas bacterias tienen una elevada capacidad de capturar ADN exógeno.

3. *Del entorno genético del donador y receptor.* El éxito adaptativo de un gen, no solo está condicionado por su prevalencia en el entorno, sino por la promiscuidad del vehículo que puede transportarlo (plásmido, transposón, integrón, fago...), por el rango de hospedador, por los fenómenos de exclusión plasmídica o los sistemas de restricción / modificación a nivel de ADN. Todos ellos son mecanismos determinantes en este aspecto.

4. *Del nivel de expresión.* Únicamente aquellos genes que puedan expresarse en microorganismos patógenos humanos son susceptibles de ser seleccionados y potencialmente contribuir a la resistencia.

5. *De la tasa de replicación (fitness).* La adquisición de determinantes de resistencia, como por ejemplo la adquisición de *ampC* en *Salmonella*, puede tener un coste biológico elevado. La aparición de mutantes resistentes a fosfomicina por mutación puntual en genes cromosómicos tiene un elevado coste, y solo serán seleccionados bajo fuerte presión selectiva, siendo contra-seleccionados cuando dicha presión deje de ejercerse. En ambos casos, este tipo de mutantes no serán seleccionados de manera estable salvo que la selección sea lo suficientemente duradera para que se seleccionen mutaciones compensatorias que restauren el déficit de *fitness*.

1.2 Algunos ejemplos de transferencia de genes de resistencia desde bacterias medioambientales a bacterias patógenas para el hombre.

Estudios retrospectivos han demostrado que los genes de resistencia estaban presentes en la bacterias medioambientales antes de que se generalizara el uso masivo de los antibióticos por el ser humano. Así, por ejemplo, 4 de 30 cepas de *Escherichia coli* que fueron liofilizadas antes de 1950 fueron resistentes a todos los antibióticos testados cuando se resuspendieron muchos años después. Otro ejemplo: de las 433 cepas de *Enterobacterias* coleccionadas alrededor del mundo entre 1917 y 1952 (colección Murray), 11 resultaron resistentes a ampicilina o tetraciclina. Las reconstrucciones filogenéticas de serin- β -lactamasas sugieren que su origen ocurrió hace 2000 millones de años y su presencia en plásmidos desde hace varios millones de años. Probablemente una de las demostraciones más contundentes sobre el origen ancestral de la resistencia antibiótica fue aportado recientemente por *D'Costa y col.* Cuando analizaron muestras de hielo del Pleistoceno en regiones de Alaska y encontraron determinantes de resistencia a ampicilina, tetraciclina o glicopéptidos (5).

El microbioma medioambiental alberga un enorme *resistoma* (conjunto de genes con capacidad para facilitar el crecimiento bacteriano en presencia de sustancias tóxicas para la bacteria). Muchos genes de ese resistoma medioambiental (en su mayor parte desconocido) han sido transferidos a bacterias relacionadas con el entorno del ser humano, llegando en algunos casos a ser verdaderos problemas de Salud Pública.

La aparición en 1993 de las β -lactamasas tipo CTX-M (6), de las que se conocen al menos 150 variantes pertenecientes a 5 grandes linajes, han llegado a ser las β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) más prevalentes en todo el mundo, causando verdaderos problemas de resistencia en países como Reino Unido, Japón o España. Estas β -lactamasas parecen tener su origen en bacterias del medio ambiente. En concreto se han identificado diferentes especies de *Kluyvera* como el posible origen de los diferentes linajes.

La resistencia a las quinolonas ha sido el paradigma de resistencia cromosómica por mutación en el gen *gyrA* (y *parC* en Gram-positivos) en bacterias Gram-negativas. La identificación de genes de resistencia a quinolonas transferibles en elementos móviles supuso una conmoción en el mundo de la resistencia antibiótica (7). Estos determinantes llegaron a ser extraordinariamente prevalentes en algunas regiones de Hong Kong. Están codificados en los genes *qnr*, cuyo origen podría estar en especies de origen acuático como *Shewanella*.

En bacterias Gram-positivas uno de los ejemplos más característicos es la resistencia a β -lactámicos en *Streptococcus pneumoniae* por alteración de las PBP por recombinación con PBP de *Streptococcus* ambientales. También la resistencia a β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*, resistentes a meticilina por adquisición del gen *mecA*, que codifica para la PBP2' procedente de *Staphylococcus sciuri*. Ambos son ejemplos de mutirresistencia a antibióticos β -lactámicos en bacterias patógenas humanas que causan serios problemas de resistencia en la práctica clínica. Estos ejemplos sirven para demostrar que el fenómeno de la diseminación de determinantes de resistencia es inconsistente con la hipótesis de una emergencia reciente. Este fenómeno ha ocurrido a una velocidad muy lenta antes de la “era antibiótica” pero que el uso masivo de los antibióticos tan solo ha acelerado y seleccionado tanto los determinantes de resistencia como los sistemas de transferencia.

1.3 Ecología del tracto gastrointestinal humano.

Se estima que las bacterias existen sobre La Tierra desde hace aproximadamente 3.800 millones de años. Durante este tiempo han evolucionado y se han adaptado a multitud de nichos ecológicos, desde aquellos que representan condiciones extremas de vida (de temperatura, pH, o salinidad), a ambientes complejos con gran competencia con otras formas vivas por los escasos recursos, como el organismo humano. Solamente en el tracto gastrointestinal (TGI) de cada individuo vive un número aproximado de 10^{14} bacterias, lo que supone un orden de magnitud superior al número total de células humanas en ese individuo, estimado en 10^{12} - 10^{13} células. Si multiplicamos esta cifra por el total de la población humana, obtenemos la estratosférica cifra de aproximadamente 10^{24} bacterias a las cuales nuestro TGI sirve de reservorio. Otros nichos de gran importancia en el organismo humano son las fosas nasales, la cavidad orofaríngea, la piel y el sistema urogenital. Todos ellos constituyen el microbioma humano. Una actividad científica frenética se desarrolló en los últimos años para, con la ayuda de las tecnologías de secuenciación masiva, caracterizar el universo microbiano que constituye el denominado segundo genoma humano (8). La idea de que el cuerpo humano es colonizado por microbios es, hoy en día, simplemente un error (9). El organismo humano, igual que muchas otras formas vivas, es el resultado de una estable asociación entre células de diferentes orígenes, desde la mitocondria en la célula eucariota o la microbiota anclada a la superficie de la piel. Por lo tanto, la microbiota intestinal es hoy considerada como un nuevo órgano (10).

El TGI humano es un ecosistema muy diverso, constituido por un elevado número de especies bacterianas pertenecientes a los 3 dominios de la vida (*Eukarya*, *Bacteria*, y *Archaea*). El dominio *Bacteria* representa el 99.1% de toda la diversidad, 0.1% *Eukarya* y secuencias de origen viral y el resto *Archaea* (11). Dentro del dominio bacteria se pueden identificar la presencia de los 5 phyla mayoritarios (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* y *Proteobacteria*). Distinguimos cinco regiones diferentes por su población microbiana en el TGI, a saber: la cavidad oral, el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso o colon. Las regiones distales del TGI (cavidad oral y colon) son, por su posición anatómica, las que presentan una mayor biodiversidad y mayor número total de microorganismos. Se puede distinguir entre microorganismos *alóctonos*, que alcanzan un nuevo nicho aunque sean de manera transitoria, generalmente desde las regiones superiores en altura hacia las inferiores (*flujo fecal-oral*), y microorganismos *autóctonos*, que representan la población estable en un nicho dado con una función demostrable en el ecosistema al que pertenecen (comensales).

La diversidad de especies bacterianas y su frecuencia varía entre individuos y en un mismo individuo. Se han identificado factores que influyen alterando el equilibrio del complejo ecosistema del TGI, como por ejemplo condiciones fisiológicas de los individuos tales como la dieta (el microbioma de un mismo individuo difiere entre el verano y el invierno), la edad (la diversidad inter-individuos aumenta con la edad) (12), o la localización geografía del individuo (13). Esta fluctuación en la composición del microbioma dependiente de tantos factores, ha llevado a hablar del órgano volátil (14). Pero pese a esa aparente volatilidad, existen parámetros que se mantienen en todos los individuos analizados. La mayoría de las especies identificadas pertenecen a los phyla *Firmicutes* (95% pertenecen a la clase *Clostridia*) y *Bacteroidetes* (15). 57 especies representan el 90% de toda la diversidad, pero se calcula el número de especies diferentes en ~500-1000 especies. En la tabla 1 podemos ver la distribución de los principales phyla del TGI humano. Es de destacar el sorprendente descubrimiento de la gran diversidad microbiana en el estómago, a pesar de su bajo pH, superándose la antigua idea de la preeminencia de *Helicobacter pylori*, junto a la creencia de una baja diversidad bacteriana en este nicho.

Diversidad bacteriana en el TGI	
Compartimento del TGI	Phyla detectados
Cavidad oral	<i>Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, SR1, TM7, Cyanobacteria, Spirochaetes, Tenericutes, Synergistetes</i>
Esófago	<i>Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, TM7.(1)</i>
Estómago (1-10 ²)	<i>Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria.(2)</i>
Intestino delgado (10-10 ⁴)	<i>Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria (*)</i>
Colon (10 ¹² -10 ¹⁴)	<i>Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Spirochaetes, VadinBE97.</i>

Tabla 1. Diversidad bacteriana en el TGI. (1) Las poblaciones de la región distal del esófago son similares a las de la cavidad oral. (2) Poblaciones significativamente diferentes de las del esófago y la cavidad oral. (*) Muy poco estudiado.

Hay que tener en cuenta que los compartimentos internos (esófago, estómago, intestino delgado) han sido mucho menos estudiados, debido sobre todo a la dificultad técnica de la toma de muestras en los mismos, así como la mayor dificultad a la hora de distinguir a los microorganismos autóctonos.

En cualquier caso, parece lógico asumir que un sistema biológico tan complejo como el microbioma humano debe tener una gran influencia en la salud del organismo hospedador. La evidencia experimental no hace sino apoyar esta asunción, registrándose un número creciente de estudios que pone de manifiesto este extremo. Un desequilibrio del complejo ecosistema microbiano se ha postulado como la base de algunas patologías como obesidad o enfermedad de Crohn (16). Con el objetivo último de mejorar la salud humana, se puso en marcha un gran esfuerzo para ampliar nuestro conocimiento sobre el microbioma (Human Microbiome Project). Así se han realizado estudios comparativos del microbioma en diabéticos, pacientes con cáncer intestinal, transplantados, fibrosis quística, etc. (17, 18, 19, 20).

Los primeros trabajos sobre el microbioma humano se limitaron a cuantificar la biodiversidad de organismos presentes. Tras estos trabajos iniciales, se analizó la relación existente entre las diferencias observadas en la composición del microbioma y algunas patologías. Posteriormente se iniciaron estudios de metagenómica, es decir, identificar el acervo genético presente en el nicho, con independencia de las especies de las que proceden, con objeto de elucidar la red de relaciones fisiológicas y metabólicas que se establecen entre los miembros del ecosistema. Esta aproximación nos revela las profundas interacciones que existen entre los miembros de la comunidad (21), definiendo las rutas metabólicas explotadas por la comunidad usando el servidor *KEGG* (22).

El estudio del microbioma intestinal humano también está sirviendo como un sistema modelo para tratar de solventar las dificultades técnicas y teóricas que este conocimiento plantea. Por ejemplo, las diferencias en el número de copias de 16S rRNA (marcador para identificar especies en estudios metagenómicos) entre diferentes especies suponía que algunas especies podrían estar sobrerrepresentadas de manera artificial. Estudios de correlación de qPCR y análisis filogenéticos fueron establecidos para comparar la validez de los sistemas de estimación basados en 16S rRNA. Finalmente se ha desarrollado como método complementario al análisis metagenómico el denominado *culturomics* (23). Esta nueva aproximación consiste en cultivar la misma muestra en un número enorme de medios de cultivos diferentes. Los resultados obtenidos permiten identificar nuevas especies que el análisis metagenómico era incapaz de identificar.

Como se acaba de mencionar, esta nueva tecnología, actualmente en proceso de escalado, ha permitido la acumulación de un gran número de datos de secuencia, lo cual está permitiendo una mejor aproximación a la estructura real del microbioma del TGI humano. Las nuevas secuencias son asignadas por comparación con las bases de datos a uno u otro grupo filogenético, por similitud estadísticamente significativa con secuencias de grupos bien definidos. Los árboles filogenéticos basados en relojes moleculares como el 16S ARNr han permitido versiones cada vez más precisas del “árbol de la vida”. A medio plazo, la ingente cantidad de información que se están generando gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación, permitirá definir de manera cada vez más precisa los nodos y ramas menos claras. Sin embargo, mientras el número de secuencias y de genes identificados crece exponencialmente, no ocurre lo mismo con los estudios que asocian cada gen con su función, existiendo un desfase entre la información almacenada sobre las secuencias y la registrada con respecto a la fisiología y la ecología de las especies descubiertas. Es imperativo que se incrementen los esfuerzos de análisis gen-proteína-función, puesto que si el número de secuencias se ve ampliamente incrementado pero no existe posibilidad de asociarlos más que a un número mucho menos significativo de funciones fisiológicas, la interpretación de las relaciones ecológicas y evolutivas entre los microorganismos del microbioma del TGI será muy imprecisa y estos errores nos arrojarán una visión incompleta e inexacta del problema que pretendemos resolver.

Además de los ya mencionados, el estudio y la comprensión de la estructura y dinámica del microbioma humano plantea otros problemas metodológicos y teóricos. Uno de los principales objetivos en el momento actual es la identificación de un grupo mínimo de especies bacterianas presentes en todos y cada uno de los seres humanos. Este grupo mínimo sería condición *sine qua non* para mantener la salud del individuo. Evidentemente, esto equivaldría a identificar el grupo de

funciones metabólicas y fisiológicas básicas necesarias para establecer la red mínima que mantenga la simbiosis con el hospedador, las cuales deben estar mantenidas por estas especies. Sin embargo, definir este consenso mínimo no es sencillo, puesto que se advierten variaciones significativas tanto entre los diferentes compartimentos del TGI en un mismo individuo como en los mismos compartimentos entre diferentes individuos. Definir un consenso que consideremos como flora normal microbiana no es algo sencillo. Muy probablemente, la diversidad microbiana mayoritaria del TGI es una característica fenotípica individual, y como tal debe considerarse. Posiblemente, el abordaje más adecuado en aras de lograr un consenso necesario en la práctica es la identificación de un consenso a nivel funcional, es decir, debemos identificar las redes metabólicas y fisiológicas básicas establecidas entre el microbioma y su relación con el hospedador, independientemente de los organismos individuales que la sostengan.

En este sentido, es sabido que existe una disminución significativa de la diversidad bacteriana tras el sometimiento a un tratamiento prolongado con antibióticos. Tras la finalización del tratamiento con antibióticos, las poblaciones se recuperan a medio plazo, si bien se observan desplazamientos de unos taxones por otros de modo general, mientras que la salud del individuo se mantiene, lo que indica un mantenimiento de las redes metabólico-fisiológicas básicas intactas, incluso tras la desaparición definitiva (comprobada a largo plazo) de taxones concretos.

1.4 La microbiota intestinal humana como reservorio de resistencias a los antibióticos.

Desde hace mucho tiempo se asumían dos conceptos en resistencia antibiótica como verdades globales, si bien carecían de un soporte científico consistente, o éste era indirecto. Estos conceptos presuponían, primero, que los determinantes de resistencia antibiótica deberían existir en la naturaleza antes de su uso y abuso por el ser humano (los determinantes de resistencia a β -lactámicos naturales existían en las cepas productoras de estos antibióticos naturales) (24). Desde esos organismos los determinantes se difundieron a otras bacterias ambientales, de aquí a bacterias no patógenas y finalmente a bacterias patógenas. En segundo lugar, y enlazado con este primer concepto, las bacterias del TGI habrían tenido un papel relevante como vehículo de transmisión (25), pues habrían sido bacterias reiteradamente expuestas a antibióticos lo que habría facilitado la selección de variantes resistentes, bien por mutación cromosómica o por fenómenos de transferencia horizontal (26, 27).

Hoy en día disponemos de suficiente información para matizar o enfatizar estas aseveraciones. Aunque es cierto que los determinantes de resistencia han fluido entre bacterias ambientales y bacterias patógenas, tanto en el pasado como en la actualidad (28), no es tan evidente que la hipótesis del organismo productor de antibióticos sea el responsable de la diseminación de los determinantes de resistencia, ya que existe una alta divergencia genética entre los genes de resistencia en estos organismos y los encontrados en bacterias patógenas (29). Los determinantes de resistencia han estado ampliamente diseminados en el ambiente (30) desde hace más de 30.000 años (31) y que las bacterias patógenas han sido generadoras de sus propios mecanismos de resistencia (32). La secuenciación masiva del microbioma de individuos sanos ha revelado una cantidad significativa de determinantes de resistencia, algunos conocidos como β -lactamasas tipo CTX-M-15 o TEM y otras muchas no conocidas. *Sommer y col.* encuentran hasta 93 determinantes de resistencia confiriendo resistencia fenotípica, entre ellas 27 β -lactamasas (33), confirmando la idea de que el microbioma intestinal es un reservorio de resistencia (34, 35). Ahora bien, el proceso de transferencia desde bacterias comensales del intestino hasta bacterias patógenas es todavía un proceso poco aclarado (36). Aunque actualmente sabemos que la secuenciación de genomas completos ha permitido identificar que la tasa de transferencia horizontal en bacterias asociadas al hombre es 25 veces más frecuente en bacterias de nichos ecológicos diversos no relacionados con el ser humano ($p = 3.0 \times 10^{-270}$) (37) La posibilidad de hacer estudios de epidemiología metagenómica abre una nueva oportunidad al control de la resistencia antibiótica y su diseminación (38). Los futuros estudios metagenómicos deberían tener en consideración:

- 1.- No solo cómo se altera y recupera la microbiota después de sucesivos ciclos de exposición a antibióticos (por ejemplo en paciente crónico), sino cómo cambia la tasa de resistencia en la población bacteriana después de la exposición al antibiótico. (39).

- 2.- Identificación de especies o grupos bacterianos que constituyan consorcios de alto intercambio genético donde particulares elementos móviles portando determinantes de resistencia puedan circular (40).

- 3.- Identificación y subsanación de clones altamente resistentes y transmisibles antes y después de un proceso de stress antibiótico prolongado (largas estancia en hospitales).

- 4.- Caracterización individual del mobiloma.

Como puede adivinarse, en todo lo expuesto subyace la idea de la transferencia horizontal de genes de resistencia. Un ejemplo extremo es la presencia del gen *tet(X)* en el anaerobio estricto *Bacteroides*, siendo este gen no funcional en anaerobiosis (40). Sin embargo la detección de

bacterias diferentes portando genes similares en un 95% a nivel nucleotídico, sugiere un proceso de transferencia horizontal, si bien no podemos establecer la direccionalidad. El TGI humano ofrece abundantes nutrientes, multitud de microambientes y muchas superficies a las que las bacterias pueden fácilmente adherirse (41). En este ecosistema, en el que la presencia de un comensal puede estar condicionada por la de otros, estableciéndose un entramado de interacciones (42), la pérdida o ausencia de alguna bacteria comensal puede alterar el equilibrio biológico facilitando el desarrollo de procesos patológicos (43). En este escenario de “requerimientos recíprocos” parece estar facilitado el intercambio genético por transferencia horizontal para evitar que algún miembro del ecosistema pueda ser eliminado, provocando una cascada de pérdidas que podría alterar el conjunto de la red(44). Un escenario similar se observa en la cavidad oral (45). En este continuo flujo de información genética los genes de resistencia antibiótica son un muy buen ejemplo de lo ventajoso que puede resultar para una comunidad bacteriana que sus miembros contengan los mismos determinantes (46). Ésta podría ser una de las causas o constricciones de porque algunas familias de determinante de resistencia con alta homología entre sí no hubieran sido transferidas desde bacterias comensales a microorganismos patógenos. Los determinantes de resistencia antibiótica presentes en las bacterias comensales que constituyen el microbioma intestinal forman parte de complejos y grandes estructuras y por tanto más difíciles de movilizar que genes individuales (47). Por lo tanto la caracterización no solo de los determinantes de resistencia que constituyen el resistoma intestinal, sino también los entornos genéticos donde están presentes es hoy en día de una importancia crucial para inferir que determinantes de resistencia tienen más posibilidades de ser transferidos y seleccionados en bacterias patógenas.

2. La importancia taxonómica de *Acidaminococcus*.

Acidaminococcus es un miembro habitual del ecosistema intestinal humano y de otros animales homeotérmicos, son una población similar a la de *E. coli*. Sus peculiares características estructurales la convierten en una bacteria muy interesante desde el punto de vista ecológico y evolutivo. Se trata de una bacteria Gram-negativa, y como tal tiene doble membrana con lipopolisacárido (LPS), es resistente a antibióticos como la vancomicina (específicamente eficaz frente a bacterias Gram-positivas) y es negativo en la tinción de Gram. Por estas razones fue inicialmente clasificado como diplococo Gram-negativo dentro de la familia *Veillonellaceae*. La revolución molecular basada en la relación filogenética del 16S rDNA sorprendentemente reclasificó esta bacteria como miembro del orden *Clostridiales*, es decir filogenéticamente es un Gram-positivo (48). ¿Cómo resolver esta aparente paradoja? ¿Se trata de un microorganismo Gram-positivo o Gram-negativo?

La discriminación entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas permanece como una herramienta esencial del diagnóstico microbiológico. La dicotomía entre Gram positivo / Gram negativo es considerada como una de las profundas transiciones de la evolución de los procariotas en monodermas (una sola membrana celular) y didermas (dos membranas). Por tanto la presencia o ausencia de membrana externa no es un tema trivial en la evolución bacteriana. La definición taxonómica de esta especie tendrá importancia ecológica y evolutiva.

2.1. El orden *Negativicutes*. Clase *Selenomonadales*. Familia *Acidaminococaceae*.

La capacidad y facilidad para identificar nuevas especies bacterianas gracias a los análisis metagenómicos que permiten ahora el desarrollo de una potente tecnología de secuenciación profunda y análisis bioinformático, ha permitido identificar nuevas especies con características estructurales similares a las expuestas para *Acidaminococcus* que están ayudando a definir un escenario evolutivo nuevo.

Inicialmente *Acidaminococcus* fue descrito dentro de la familia *Neiseriaceae* (49), aunque posteriormente se reclasificó basado en sus características fenotípicas dentro de la familia *Veillonellaceae* que englobaba los géneros *Veillonella*, *Acidaminococcus* y *Megasphaera*. El género *Acidaminococcus* estaba constituido por una sola especie, *A. fermentans*. Estas especies fueron posteriormente reclasificadas en el cluster IX (Rama *Sporomura*) del *phylum Clostridium* basadas

en el análisis del 16S DNAr. En 2007 una nueva especie de *Acidaminococcus* es descrita, *A. intestini* (50), que permite la definición de la familia *Acidaminococcaceae*. Finalmente la descripción en 2009 de la especie *Negativicoccus succinicivorans* (51) supuso una verdadera revolución en la resolución taxonómica de estas especies bacteriana. Desde este momento se determinó que esta familia constituía por sí misma una línea lo suficientemente robusta dentro del phylum *Firmicutes* como para ser separada de las clases *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichales* y *Thermolithobacteria*. Se definió así la nueva clase *Negativicutes*. Dentro de la clase *Negativicutes* se estableció el único orden *Selenomonadales*, dentro del cual se incluyeron las familias: *Veillonellaceae* (30 géneros) y *Acidaminococcaceae* (4 géneros). Los cuatro géneros bacterianos dentro de la familia *Acidaminococcaceae* son: *Acidaminococcus*, *Phascolarctobacterium*, *Succiniclasticum* y *Succinispira*. La familia comprende especies de cocos, o con forma curvada o pleiomórfica, anaerobios Gram-negativos, no esporulantes, móviles e inmóviles. No fermentan carbohidratos, excepción hecha de la especie *Acidaminococcus fermentas*, en cuyas cepas se observa una débil fermentación de la glucosa. Emplean aminoácidos como fuente de energía (no en todos los casos). Se observa crecimiento con producción de propionato o succinato (no en todos los casos).

Es característica común a los miembros de la clase *Negativicutes* la disponibilidad de dos bicapas lipídicas y concéntricas. La membrana citoplásmica y la membrana externa, típica de los Gram-negativos dentro de la división del phylum *Firmicutes*. Estas características intermedias entre Gram-positivas y Gram-negativas no son exclusivas de esta clase bacteriana dentro del phylum *Firmicutes*. En la clase *Clostridia*, la familia *Halanaerobiales* también presenta características intermedias (52) lo que sugiere que el proceso que dio lugar a la formación de estas estructuras intermedias ocurrió en al menos dos ocasiones, es decir existe un origen polifilético para la formación de estas estructuras intermedias.

2.2. Significación biológica de los *Negativicutes* en la evolución.

Como se comentaba anteriormente, la tinción de Gram es un método fundamental en un laboratorio de Microbiología (53) pero probablemente sea una simplificación excesiva que no represente la verdadera diversidad de la envuelta bacteriana. Existen linajes bacterianos que podrían representar estados intermedios de la transición entre monoderma y diderma. Lake sugiere que estas bacterias intermedias entre Gram positivas y Gram negativas son el resultado de una endosimbiosis

entre un *Actinobacterium* ancestral y un *Clostridium* ancestral (54). Sin embargo existen especies pertenecientes a diferentes phyla con estas características intermedias, como *Thermotogae*, *Deinococcus* o *Firmicutes* (el phylum prototipo de las monodermos). Dentro del phylum *Firmicutes* varios órdenes presentan doble membrana con LPS (*Negativicutes*, *Fusobacteria*, *Synergistetes*, *Elusimicrobia*), sugiriendo que este evento de simbiosis ha ocurrido varias veces, es decir es polifilético, probablemente debido a la heterogeneidad de *Clostridia* (55).

Por otra parte se ha sugerido que el origen de la membrana externa podría haber sido el resultado de una primitiva esporulación en algún miembro del phylum *Firmicutes* (56). Así *Acetone-ma longum*, perteneciente a la clase *Negativicutes* en el phylum *Firmicutes* es capaz de generar membrana externa con LPS por transformación desde la membrana de la endospora. Ambas teorías coinciden en el origen ancestral de estos eventos, pues los análisis filogenéticos usando los genes implicados en la biogénesis del LPS no revelan eventos de recombinación reciente (57, 58). Esta especial característica de estas bacterias sugiere que ellas pueden ser también especies clave en la transferencia de genes entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Qué fuerza selectiva fue la causante de esta profunda transición desde organismos con una única membrana a doble membrana. Según Lake, la reconstrucciones filogenéticas sugieren que pudo ocurrir coincidente con la aparición de O₂ en la atmósfera (59), pero Gupta sugiere que los antibióticos podrían ser esa poderosa fuerza de selección por que la membrana externa es una excelente barrera para evitar el acceso de algunos antibióticos como la vancomicina al interior de la célula procariota. Por otra parte, algunas bacterias Gram positivas, como *Streptomyces*, son productoras de antibióticos lo que supone una enorme ventaja adaptativa para eliminar bacterias sensibles cuando los recursos son limitados (60). Si esta hipótesis fuera cierta, las mismas bacterias que producen los antibióticos fueron también la fuente de los mecanismos de resistencia. En este escenario las bacterias con características intermedias podrían haber contribuido a la diseminación de los mecanismos de resistencia entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Si bien esta hipótesis resulta atractiva hay líneas de evidencia en que cuestionan esta visión tan simple (61).

En trabajos previos en nuestro grupo, se ha identificado una β -lactamasa, ACI-1, que confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos, incluidos las cefalosporinas sintéticas cefotaxima y ceftazidima (62) y los genes de resistencia a macrólidos, *ermB*. Esto nuevamente confirma que este microorganismo es un buen modelo para estudiar los procesos de transferencia génica que conllevan la diseminación de los determinantes de resistencia a los antibióticos.

3. Resistencia a los antibióticos en el orden *Negativicutes*.

Como se ha comentado al comienzo de esta Tesis, el tracto gastrointestinal humano es conocido como un reservorio de resistencia antibiótica (63). Las aproximaciones metagenómicas están confirmando este punto (64, 65). Como la población del tracto gastrointestinal esta constituida mayoritariamente por bacterias anaerobias, éstas deben ser principales responsables del potencial arsenal de determinantes resistencia en este nicho ecológico. *Bacteroides fragilis* es probablemente la mejor y más ampliamente estudiada bacteria anaerobia como modelo de la diversidad de determinantes de resistencia antibiótica (66). Sin embargo el impacto de otras bacterias anaerobias es poco explorado, pero la disponibilidad de genomas completos permite inferir este impacto.

Actualmente 41 genomas completos del orden *Negativicutes* están siendo secuenciados. Sin embargo solo unos pocos se encuentran en fase de disponer de un único marco de lectura y menos aún han sido publicados. De los 8 genomas completos secuenciados, publicados o no, disponibles en las bases de datos pertenecientes a este orden taxonómico (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome), los mecanismos de resistencia encontrados más comunes se refieren a determinantes de resistencia a metales (bombas de expulsión de cobre, zinc, níquel), resistencia compuestos tóxicos (arsénico, bleomicina), resistencia a telurito y genes de inmunidad a la microcina C7. Entre los determinantes de resistencia a antibióticos comúnmente empleados se detectan resistencia a bacitracina, metronidazol, resistencia a tetraciclina y resistencia a β -lactámicos incluso posibles nuevos determinantes de resistencia a vancomicina.

3.1 Epidemiología.

Los dos principales mecanismos de resistencia estudiados en bacterias pertenecientes al orden *Negativicutes* son la resistencia a los antibióticos β -lactámicos y la resistencia a las tetraciclinas. Sin embargo no son los únicos determinantes de resistencia descritos. Entre 5-10% de las especies de *Veillonella*, género más comúnmente estudiado perteneciente al orden *Negativicutes*, son resistentes al metronidazol y 65% son resistentes a macrólidos (67). Sin embargo no se ha caracterizado ningún gen implicado en la resistencia a macrólidos y solo un gen de resistencia a metronidazol, *nimE* (68), inicialmente descrito en *B. fragilis*. Otro miembro de la familia *Veillonellaceae*, el género *Dialister*, presenta patrones de sensibilidad contrarios a *Veillonella* spp. Así, el 37% son resistentes a metronidazol, mientras que solo 12% son resistentes a macrólidos (eritromicina) y estreptogramina (pristinamicina), (69) mientras que las especies de *Veillonella* son

intrínsecamente resistentes por impermeabilidad de membrana (70).

La resistencia en la familia *Acidaminococcaceae*, alcanza el 43% de resistencia a metronidazol, 57% a tetraciclina o 15% a fosfomicina (71).

3.2 Resistencia a β -lactámicos. Frecuencia, mecanismos, genes.

Aunque los recientes análisis de genomas completos de especies pertenecientes al orden *Negativicutes*, sugieren la presencia de un alto número de genes (al menos 10 de *A. fermentans* y *A. intestini*) con alta homología con β -lactamasas, tradicionalmente la sensibilidad a los antibióticos β -lactámicos en la familia *Acidaminococcaceae* ha sido universal (71, 72) hasta la descripción de la β -lactamasa ACI-1 por nuestro grupo en *A. intestini* (73). Esta β -lactamasa es clasificada como 2be según el esquema de Bush-Jacoby y Medeiros (74), ya que confiere resistencia a las cefalosporinas sintéticas cefotaxima y ceftazidima. La reconstrucción filogenética de esta β -lactamasa, evolutivamente alejada de otras β -lactamasas descritas, presenta más similitud con las descritas en bacterias Gram-positivas (75).

Por el contrario en la familia *Veillonellaceae*, la resistencia a β -lactámicos ha sido descrita desde hace tiempo, pero el mecanismo de resistencia no es debido a la presencia de β -lactamasas (76), sino por alteración de PBPs que reduce la afinidad por el antibiótico β -lactámico (77). La resistencia a β -lactámicos en aislados de *Veillonella* era de tan solo 5% en 1976 (78) y ha alcanzado hasta más 65% (79, 80) en la actualidad. En otras especies es extraordinariamente escasa la descripción de la epidemiología de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos. En *Megasphaera elsdenii*, se describe menos del 10% de resistencia (81), pero no hay descripción sobre el mecanismo de resistencia implicado.

3.2.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Las resistencias a los β -lactámicos pueden deberse a:

1.- Modificaciones en las PBP, de modo que disminuya su afinidad por los β -lactámicos. Este mecanismo es mayoritario entre las bacterias Gram-positivas.

2.- Genes de resistencia a los β -lactámicos, codificando enzimas β -lactamasas, las cuales modifican o degradan los β -lactámicos antes de que puedan acceder a las PBP. Éstas pueden ser excretadas al medio extracelular (en Gram-positivos) o contenidas en el espacio periplásmico (en los Gram-negativos).

3.- Disminución de la permeabilidad por reducción del número de porinas de la pared bacteriana. Exclusivo de Gram-negativos (especialmente en *Pseudomonas*).

4.- Expulsión del β -lactámico mediante canales de eflujo (sobre todo en Gram-negativos).

5.- Fenómeno de tolerancia a los β -lactámicos, posiblemente debido a una reducción en la síntesis de autolisinas (hidrolasas del peptidoglicano). En estas condiciones el antibiótico actúa como bacteriostático.

Clasificación de las β -lactamasas ¹							
Grupo	Clase	Sustrato preferente	Inhibido por		Gen	β -lactamasas representativas	
		CLV	CLV	EDTA			
1	C	Cefalosporinas	-	-	C, P	AmpC, MIR, FOX, CMY	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
2a	A	Penicilinas	+	-	C/P	A, B, C, D (<i>S. aureus</i>)	<i>S. aureus</i>
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas 1 ^a G	+	-	P	TEM-1, TEM-2, SHV-1	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
2be	A	Cefalosp. 1 ^a -4 ^a G, monobactams	+	-	P, C	ESBL (TEM, SHV, CTX-M), K1 de <i>K. oxytoca</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>K. oxytoca</i>
2br	A	Penicilinas, inhibidores	+/-	-	P	IRT	<i>Enterobacteriaceae</i>
2c	A	Penicilinas, carbenicilina	+	-	P	PSE-1, PSE-3, PSE-4	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
2d	D	Penicilinas, cloxacilina	+/-	-	P	OXA-1	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
2de	D	Cefalosp. 1 ^a -4 ^a G	+/-	-	P	ESBL (OXA)	<i>P. aeruginosa</i>
2e	A	Cefalosp. 1 ^a -4 ^a G	+	-	C	Cefuroximasa	<i>P. vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, cefalosp. 1 ^a -3 ^a G., carbapenems	+	-	C	IMI-1	<i>E. cloacae</i> , <i>S. marcescens</i>
3	B	Penicilinas, cefalosp. 1 ^a -3 ^a G., carbapenems	-	+	C, C/P, P	L1, CcrA, IMP, VIM	<i>S. maltophilia</i> , Grupo de <i>B. subtilis</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
4	nd	Penicilinas	-	?	C, P	SAR-2	<i>B. cepacia</i> , <i>E. coli</i>

Tabla 2. Clasificación de las β -lactamasas. CLV: clavulanato; C: cromosómico; P: plasmídico; ESBL: β -lactamasa de espectro extendido.¹ Tomada de Cantón, R. *Chap. 22: Epidemiology and evolution of β -lactamasas. Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens*. Edited by Baquero *et al.* ASM Press, 2008. Mobile DNA: an introduction. Craig N.L. Chapter 1. Mobile DNA II, edited by N. L. Craig *et al.* 2002 ASM Press.

Existen dos criterios empleados para clasificar las distintas β -lactamasas: según la estructura primaria de la molécula (clases A, B, C y D) o bien en grupos funcionales (según su espectro de actividad, perfil de sustratos y respuesta a los inhibidores).

En la tabla 2 aparece esbozada la clasificación y principales miembros de cada grupo. Las PBP presentan gran identidad con las β -lactamasas, estando relacionadas tanto desde el punto de vista estructural como evolutivo, postulándose que ambas proceden de un hipotético ancestro común. Frecuentemente, los genes que participan en la síntesis de antibiótico, aparecen ligados en el mismo grupo (*cluster*) a genes tanto de β -lactamasas (*bla*) como de PBP's.

Algunos de los genes *bla* más exitosos, proceden de loci cromosómicos en bacterias ambientales, desde donde se han dispersado eficazmente merced a mecanismos de transferencia génica horizontal (82). Esto sucede porque frecuentemente están ligados a elementos genéticos móviles, junto al efecto potenciador que supone el uso exhaustivo en clínica de estos antibióticos. Así, desde el descubrimiento de la primera β -lactamasa en *E. coli* en 1940, que fue tomado como intrascendente, actualmente más del 90% de las cepas de *S. aureus* producen penicilinasas o el 60% de las de *E. coli* son resistentes a ampicilina y las resistencias suponen un gasto sanitario y un esfuerzo investigador clave. La β -lactamasa TEM-1, descubierta en *E. coli* en 1963 fue el primer gen de resistencia a aminopenicilinas. Este gen se transfería ligado a un transposón (Tn3). En la misma época aparece TEM-2 que difiere de TEM-1 en tan solo una mutación puntual. Los genes de las TEM se han extendido por todas las especies de Enterobacteriaceae, Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae y en Gram-negativos no fermentadores. Se han transmitido por Tn3 y sus derivados tipo Tn21. Del mismo modo, surgieron otras enzimas, como PSE-1 (*Pseudomonas*, Enterobacteriaceae) (83), SHV-1 (*Klebsiella*) (84) y OXA-1 (*E. coli*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*) (85), asociadas asimismo a elementos móviles, sobre todo a plásmidos movilizables. El descubrimiento de los inhibidores de las β -lactamasas y la introducción de las cefalosporinas de amplio espectro a finales de los 80 permitió afrontar la situación cada vez más crítica que se estaba gestando a nivel clínico. Sin embargo, la observación de cambios adaptativos en las bacterias indica que no debe bajarse la guardia. Mutaciones en las regiones promotoras de los genes o a nivel de regulación de la expresión, tienen como resultado una sobreproducción constitutiva de β -lactamasas (K1 cromosómica de *K. oxytoca* o hiperproducción de AmpC en *P. aeruginosa*). Asimismo, se observan mutaciones en los propios genes de las β -lactamasas que conllevan un aumento en la capacidad de hidrólisis o en la afinidad por los β -lactámicos de amplio espectro, obteniéndose

variantes más efectivas. Ejemplos de esto se observan tanto en TEM, SHV, OXA, como particularmente en la ESBL CTX-M, originalmente cromosómica en *Kluyvera spp.* Así, la dispersión es exponencial, observándose aislados productores de ESBL resistentes a cefalosporinas de amplio espectro y aminoglicósidos, fluoroquinolonas y/o sulfonamidas.

Los carbapenems, introducidos a mediados de los 80, afortunadamente parecen eficaces contra estas cepas, así como son efectivos los inhibidores de las β -lactamasas. No obstante, se han encontrado derivados de TEM-1, TEM-2 y SHV-1 que eluden a los inhibidores, si bien son sensibles a cefalosporinas de espectro extendido. Por otro lado, desde finales de los 90 estamos asistiendo al surgimiento y dispersión de las metalo β -lactamasas, enzimas resistentes a los carbapenems, siendo las enzimas de la familia IMP de *Pseudomonas aeruginosa* la primera en surgir, así como las VIM o las plasmídicas de las familias SPM o GIM. Estas enzimas constituirán con toda probabilidad un problema importante en el futuro inmediato.

3.2.2 Prevalencia en la clase *Negativicutes*. Dentro de los anaerobios Gram-negativos, el género *Bacteroides* es el más estudiado, siendo más del 90% de los aislados resistentes a penicilina G. La resistencia a cefoxitin y piperacilina alcanza el 14% y 25% de los aislados respectivamente. Los estudios más recientes se ocupan de la resistencia a los carbapenems y de la actividad de las metalo- β -lactamasas en el género (86).

En el resto de anaerobios, las resistencias monitorizadas son mucho más bajas e infrecuentes, si bien la ausencia de datos se debe a la dificultad de su aislamiento e identificación, y por tanto a la escasez de datos clínicos. Los datos son por tanto escasos y muy variables. Destacan los géneros *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* y *Clostridium*. *Veillonella* es el género de *Negativicutes* que tradicionalmente ha presentado una mayor incidencia en la resistencia a los antibióticos. No obstante, los datos sobre resistencia a β -lactámicos son escasos. La primera β -lactamasa identificada en cocos anaerobios lo fue en nuestro grupo. Se trata de ACI-1, en una cepa de *A. intestini* (anteriormente clasificada como *A. fermentans*).

3.3 Resistencia a tetraciclinas.

Las tetraciclinas (revisiones en 87, 88, 89) son una familia de antibióticos poliquétidos de origen natural (clortetraciclina u oxitetraciclina) o semisintético (doxicilina o minociclina),

descritos por primera vez en 1948 (clortetraciclina, también llamada aureomicina) en el actinomiceto *Streptomyces aureofaciens* por los laboratorios Lederle (subsidiaria de la *American Cyanamid Company*) (90). Seguidamente, en 1950, aparece la oxitetraciclina (comúnmente conocida como terramicina) comercializada por laboratorios Pfizer. Estas moléculas naturales constituyen las denominadas tetraciclinas de primera generación (aquellas descritas entre 1948 y 1963). Las tetraciclinas de 2ª generación, como minociclina y doxicilina, descritas en el período que va de 1965 a 1972 fueron diseñadas para aumentar la vida media y biodisponibilidad de las tetraciclinas existentes. Finalmente, a partir de 1988 la *American Cyanamid Company* inició un programa de búsqueda de fármacos análogos a las tetraciclinas que fueran activos frente a microorganismos resistentes a éstas. Fruto de ello fue la síntesis de un nuevo derivado que ha recibido el nombre genérico de glicilciclinas por incluir en su estructura un radical dimetil glicil amido (tigeciclina) (91, 92), comercializada en 2005 en E.E.U.U. (2006 en Europa), por laboratorios Wyeth.

En general, son antibióticos de amplio espectro, activos contra Gram-positivos (*S. aureus*, *S. pyogenes* o *L. monocytogenes*), Gram-negativos (*Brucella*, *Legionella*, o *Helicobacter*), contra organismos como *Mycobacterium*, *Coxiella*, *Chlamidia*, *Borrelia* o *Rickettsia* e incluso contra protozoos como *Entamoeba histolytica* o *Balantidium coli*. Su amplio espectro de acción unido al bajo coste económico de estos compuestos ha favorecido en el pasado el uso extensivo de las tetraciclinas, tanto para uso humano como veterinario e incluso en agricultura, especialmente en los países en vías de desarrollo (www.whooc.no/atcddd). Sin embargo, en países desarrollados como España tan solo representan en la actualidad 0,4 DDD/1000 hab. de los aprox. 20 DDD/ 1000 hab. que representa el consumo total de antibióticos (93), manteniéndose casi constante o ligeramente decreciente desde 1990.

3.3.1 Mecanismo de acción de las tetraciclinas. Las tetraciclinas penetran a través de la membrana citoplásmica por un proceso dependiente de energía, por lo que se acumula dentro de la célula bacteriana. Son antibióticos bacteriostáticos que inhiben la síntesis proteica por unirse a la subunidad 30S del ribosoma bloqueando la unión del aminoacil-tRNA al sitio A (aminoacil) del ribosoma (94). Un estudio más detallado del mecanismo de acción de las tetraciclinas fue descrito por Brodersen en 2000 (95), según estos autores existen dos dianas de unión de las tetraciclinas en el ribosoma. En ambos casos, supone la unión del antibacteriano al 16S rRNA (único rRNA ribosomal de la subunidad 30S). El sitio primario (cerca del sitio A) localizado en el dominio principal 3' y el sitio secundario en la interfase de los tres dominios RNA (ver figura 2),

concretamente a la hélice H27 entre los residuos 891-894. Todas las tetraciclinas tienen el mismo mecanismo de acción, incluidas las glicilciclinas que son activas frente a bacterias que porten los determinantes de resistencia, como bombas de flujo: TetA, TetB, TetC, TetD y TetK o frente a proteínas de protección ribosomal como TetM, debido solamente al impedimento estérico del denominado anillo-D para poder ser expulsado por las bombas de flujo o atrapado por proteínas que protegen el ribosoma.

3.3.2 Mecanismos de resistencia a tetraciclinas. Poco después del descubrimiento de las tetraciclinas (1948), se describió (1953) el primer aislado bacteriano resistente a tetraciclina, en una cepa de *Shigella dysenteriae* (96). Actualmente hay descritos 41 genes de resistencia a tetraciclinas (97) agrupados en al menos tres tipos de mecanismos de acción: protección ribosomal, bombas de eflujo e inactivación enzimática. Existe un cuarto mecanismo cuyo fundamento es hasta el momento desconocido con un solo representante, *tet(U)*, descrito en 1996 en *Enterococcus faecium* (98). Otro mecanismo de resistencia a tetraciclina ha sido descrito que opera por mutaciones puntuales en el 16S rRNA, tanto en bacterias Gram positivas (99) como Gram-negativas (100).

Recientemente han aparecido en estudios metagenómicos dos nuevos genes que confieren resistencia a doxicilina y minociclina. Se trata de *galE₁* y *galE₂* con identidad con la con UDP-glucosa-4-epimerasa (101). Se define que un determinante de resistencia a tetraciclina es un nuevo gen *tet* cuando presenta una identidad en su secuencia nucleotídica inferior al 80% con otros genes *tet* descritos. Este escenario se ha complicado con las recientes descripciones de más de un determinante de resistencia en la misma cepa (102, 103), o la descripción de genes mosaico, resultado de procesos de recombinación entre al menos dos genes *tet* (104).

1.- Protección ribosomal. Los 11 genes de este grupo (ver tabla 1), con la excepción de *tet(W)*, tienen un %G+C <50%, compatible con un origen en bacterias Gram (+), aunque muchos de ellos se han descrito también en bacterias Gram (-) (p. ej. *tet(O)* (105)). Esto sugiere la hipótesis de eventos de transferencia horizontal desde bacterias Gram (+) a bacterias Gram (-) (106). Estas proteínas de protección ribosomal muestran una alta identidad con los factores de elongación EF-G y EF-Tu, lo que les permite unirse al ribosoma, cerca del sitio A (diana primaria de la tetraciclina), provocando un cambio conformacional en el ribosoma que en última instancia desune el complejo tetraciclina-ribosoma (107). Se han descrito fundamentalmente en bacterias Gram (-) como *Bacteroides* o *Pseudomonas*. La tetraciclina liberada al citoplasma podría potencialmente volverse a

unir a otro ribosoma, lo que explica que el efecto de estos determinantes solo sea detectado a bajas concentraciones de tetraciclina. Ésta es una de las razones que permiten suponer que la expresión de estos genes es dosis-dependiente del nivel de tetraciclina en el medio (108).

2.- Bombas de eflujo. Es el mecanismo de resistencia a tetraciclinas más relevante y eficiente (~60% de todas las resistencias a tetraciclina). Se han descrito 26 proteínas de membrana (tabla 1) que confieren resistencia a tetraciclinas facilitando su exportación al exterior celular por un mecanismo dependiente de energía (en contra de gradiente), reduciendo la concentración intracelular de antibiótico. A diferencia del caso anterior, son más comunes en bacterias Gram (-), donde se originaron, aunque también se han descrito en Gram (+). Estas proteínas generalmente constan de 12 dominios transmembrana, si bien aquellos determinantes comunes en Gram (+) suelen tener 14 dominios transmembrana (108). Al igual que en el caso anterior, son altamente regulables, aunque parece existir un mecanismo de regulación diferente para bacterias Gram (-) (presencia de un represor, TetR como en *Tn1721*) y para bacterias Gram (+) (atenuación translacional).

3.- Inactivación enzimática. Solo tres genes descritos, con poca significación clínica. Su mecanismo de acción implica una hidroxilación irreversible del C11 del anillo de la tetraciclina en presencia de oxígeno y de NADPH, rindiendo un producto inactivo que no puede unirse al ribosoma. Se han descrito fundamentalmente en bacterias Gram (-) como *Bacteroides* o *Pseudomonas*.

3.3.3. Prevalencia en la clase *Negativicutes*. Los genes de resistencia a tetraciclinas aparecen principalmente ligados a transposones conjugativos, lo que ha favorecido su diseminación. El gen *tet(Q)*, primero descrito en *Bacteroides* y generalmente asociado con el gen de resistencia a eritromicina *ermF*, aparece especialmente distribuido en géneros de *Negativicutes* como *Mitsuokella*, *Selenomonas* y *Veillonella*. Asimismo, aparece en *Clostridium*, género de Gram-positivos muy relacionado con *Negativicutes*. El gen *tet(M)* aparece asociado a elementos conjugativos en *Veillonella parvula* así como en *Fusobacterium nucleatum*.

Megasphaera (*tet(O)*, *tet(W)*), *Mitsuokella* (*tet(M)*, *tet(Q)*, *tet(W)*), *Selenomonas* (*tet(Q)*, *tet(W)*) y *Veillonella* (*tet(A)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(W)*) son los géneros de la clase *Negativicutes* donde se ha descrito la presencia de genes de resistencia a tetraciclinas.

Distribución de genes de resistencia a tetraciclina en bacterias del TGI humano	
Género	Genes <i>tet</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (39), <i>tet</i> (M)
<i>Actinobacillus</i>	<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (H)
<i>Aeromonas</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> (31), <i>tet</i> (34)
<i>Alcaligenes</i>	<i>tet</i> (E)
<i>Arcanobacterium</i> ²	<i>tet</i> (W)
<i>Bacteroides</i>	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (X), <i>tet</i> (36)
<i>Butyrivibrio</i>	<i>tet</i> (O), <i>tet</i> (W)
<i>Campylobacter</i>	<i>tet</i> (O)
<i>Capnocytophaga</i>	<i>tet</i> (Q)
<i>Citrobacter</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D)
<i>Eikenella</i>	<i>tet</i> (M)
<i>Enterobacter</i>	<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (M)
<i>Escherichia</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> (G) <i>tet</i> (I), <i>tet</i> (M) <i>tet</i> (Y)
<i>Eubacterium</i>	<i>tet</i> (K)
<i>Fusobacterium</i>	<i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (W)
<i>Haemophylus</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)
<i>Klebsiella</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (M)
<i>Mannheimia</i>	<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (G), <i>tet</i> (H)
<i>Megasphaera</i> ¹	<i>tet</i> (O), <i>tet</i> (W)
<i>Mitsuokella</i> ¹	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (W)
<i>Moraxella</i>	<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (H)
<i>Neisseria</i>	<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (W)
<i>Plesiomonas</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (D)
<i>Porphyromonas</i>	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (W)
<i>Prevotella</i>	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (W)
<i>Proteus</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (J)
<i>Providencia</i>	<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> (G), <i>tet</i> (I)
<i>Pseudomonas</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> (G), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (34)
<i>Salmonella</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (G), <i>tet</i> (L)
<i>Selenomonas</i> ¹	<i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (W)
<i>Serratia</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> (34)
<i>Shigella</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D)
<i>Treponema</i>	<i>tet</i> (B)
<i>Veillonella</i> ¹	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (W)

Tabla 3. Distribución de genes de resistencia a tetraciclina en bacterias del TGI humano. ¹Géneros pertenecientes a la clase *Negativicutes*. ² TGI de varias especies de mamíferos estabulados. (ARDB. Antibiotic Resistance Gene Database)

La mayoría de los determinantes identificados en la clase son genes de protección ribosomal, salvo el caso de *tet(L)*, un gen que codifica para una bomba de eflujo. La descripción de determinantes de resistencia a tetraciclina (*tet*) es mayoritaria en miembros de la familia *Veillonellaceae*, como *Selenomonas*, *Mitsuokella* y especialmente en *Veillonella* y *Megasphaera*.

Aunque la prevalencia en miembros de la familia *Acidaminococcaceae*, es muy altas (~60%), no se han descrito los mecanismos de resistencia implicados. Entre los genes encontrados en miembros de la familia *Veillonellaceae* destacan el género *Megasphaera* (*tet(O)*, *tet(W)*), *Mitsuokella* (*tet(M)*, *tet(Q)*, *tet(W)*), *Selenomonas* (*tet(Q)*, *tet(W)*) y *Veillonella* (*tet(A)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(W)*). La mayoría de los determinantes identificados en la clase son genes de protección ribosomal, salvo el caso de *tet(L)*, un gen que codifica para una bomba de eflujo. Este mecanismo, a pesar de ser el más relevante y eficiente, aparece en menor proporción.

Por otra parte, los genes *tet* cuyo mecanismo de resistencia es por protección ribosomal tienen un contenido G+C menor del 50%, compatible con un origen en bacterias Gram-positivas, con la excepción de *tet(W)*, lo que sugiere que los miembros de la familia *Veillonellaceae* pueden intercambiar genes entre bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas.

De hecho se ha podido demostrar la transferencia genética de *tet(M)* por un transposón conjugativo de la familia de Tn916 desde *Veillonella dispar* a *Streptococcus mitis* por conjugación a una frecuencia de $5,2 \times 10^{-6}$ (110) Además, se ha localizado en aislados de *Streptococcus* el gen *tet(M)* en un transposón tipo Tn916 (posiblemente, un transposón defectivo basado en Tn5397). Este transposón conjugativo porta a su vez el gen *erm(B)* de resistencia a eritromicina, ampliamente diseminado, por lo que estaríamos ante un fenómeno de diseminación cruzada, mecanismo que contribuiría a la gran diseminación de algunos de los genes *tet*. (111).

El gen *tet(W)* se describió por vez primera en el anaerobio del TGI *Butyrivibrio fibrisolvens*. Su movilización se asocia en esta especie con el transposón TnB1230, responsable de su elevada promiscuidad genética. Se ha encontrado *tet(M)* en cepas de *Mitsuokella multacida*, *Veillonella parvula* y *Selenomonas ruminantium*, aisladas en el tracto gastrointestinal de diferentes mamíferos. (112). En un estudio comparativo, pudo obtenerse información sobre los entornos genéticos de *tet(W)* en diferentes especies de anaerobios del TGI. Se identificó *tet(W)* en *Mitsuokella multacida* y *Selenomonas ruminantium*, ambas, como ya se ha mencionado, relacionadas filogenéticamente con *Acidaminococcus*. El gen *tet(W)* forma parte en estas especies (al menos en las cepas analizadas) de un transposón similar a TnB1230 de *Butyrivibrio fibrisolvens*. Además, se encontró *tet(W)* formando parte de estructuras similares en *Roseburia* sp. y *Clostridium* sp. (113).

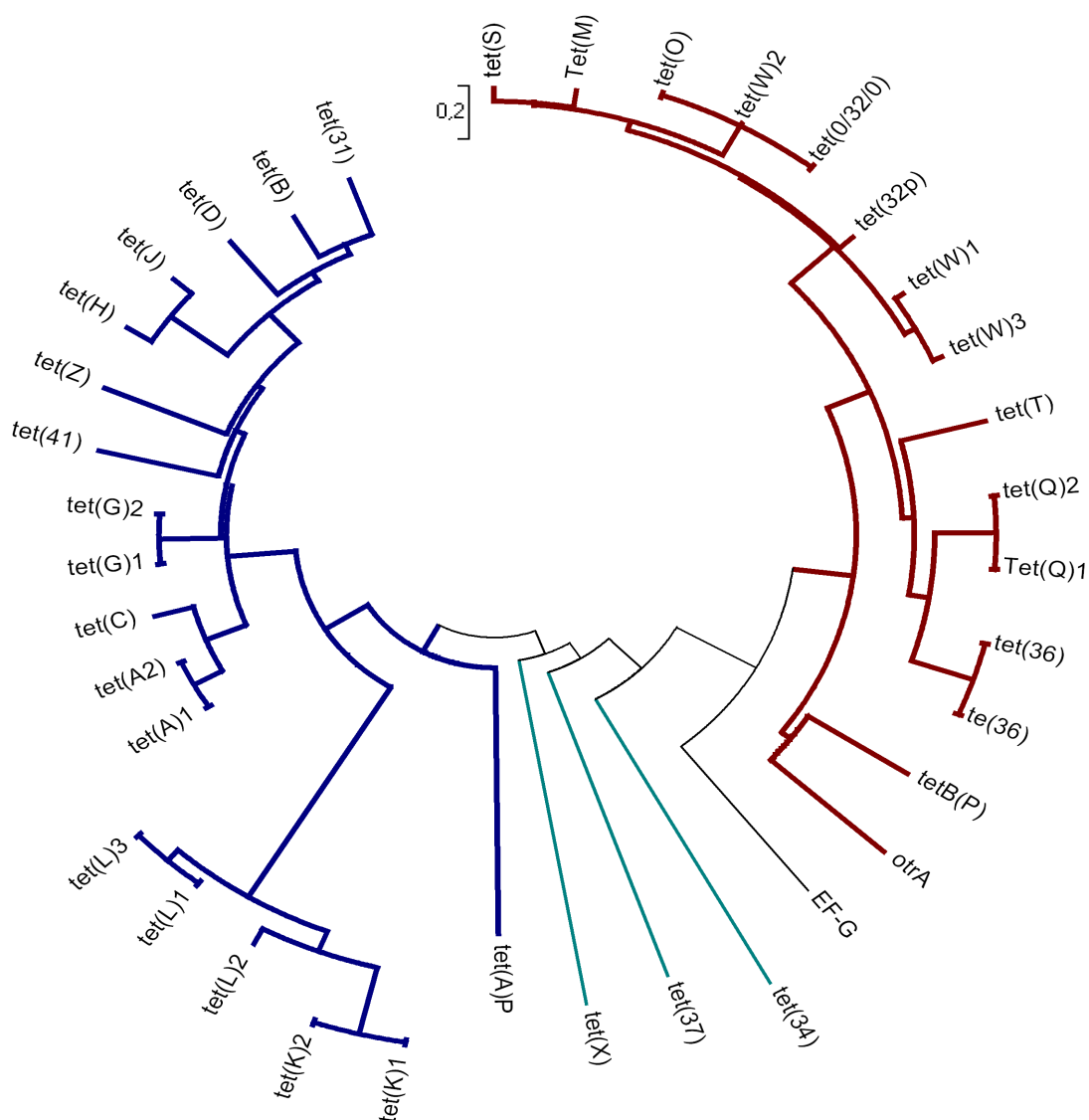


Figura 1.- Relación filogenética entre las diferentes proteínas pertenecientes a los 3 mecanismos de resistencia a tetraciclina en la Naturaleza. Árbol obtenido por máxima verosimilitud con bootstrap de 1000 replicas. Los genes de *protección ribosomal* son compatibles con un origen en bacterias Gram (+) . Estas proteínas de protección ribosomal muestran una alta identidad con los factores de elongación EF-G y EF-Tu, lo que les permite unirse al ribosoma, cerca del sitio A (diana primaria de la tetraciclina), provocando un cambio conformacional en el ribosoma que en última instancia desune el complejo tetraciclina-ribosoma (109). Los genes de *bombas de eflujo* constituyen el principal mecanismo de resistencia a tetraciclinas. A diferencia del caso anterior, son más comunes en bacterias Gram (-), donde se originaron, aunque también se han descrito en Gram (+). Los genes de inactivación enzimática tienen a día de hoy poca significación clínica, se basan en degradar el antibiótico por hidroxilación irreversible de C11 del anillo de la tetraciclina. Se han descrito fundamentalmente en bacterias Gram (-) como *Bacteroides*.

Por otro lado, se ha identificado en un estudio preliminar los *orf* inmediatamente adyacentes a *tet(32)* en *Butyrivibrio fibrisolvens*, encontrándose *orf* de nuevo con identidad con TnB1230, en *Arcanobacterium pyogenes*, donde parece estar ubicado en el elemento ATE-3 (un transposón

conjugativo) y en *Clostridium difficile*, encontrándose en el también transposón conjugativo CTn5 en esta especie. En este estudio, no obstante, apenas se comprueba la identidad de los *orf* inmediatamente adyacentes a *tet*(32), sin haberse caracterizado hasta el momento ningún transposón completo portador de este determinante de resistencia a tetraciclina (114).

Probablemente, el más interesante mecanismo encontrado en miembros de esta familia es el descrito en *Megasphaera elsdenii*, pues se trata de un determinante que es una forma recombinante entre *tet*(W)/*tet*(O) (115) sugiriendo una alta presencia de genes *tet* en especies de esta familia. A partir de la descripción del primer gen mosaico *tet*(W)/*tet*(O) en *Megasphaera elsdenii*, se han identificado hasta 7 variantes genotípicas de *tet^R* diferentes. Los genes mosaico *tet*(OWO) ofrecen los mayores valores de CMI para la tetraciclina. Así pues, la familia *Veillonellaceae* y en general los *Selenomonadales* parecen ser un arquetipo adecuado de anaerobio comensal modelo para el estudio de la evolución de los genes *tet* en el tracto gastrointestinal de los mamíferos (116).

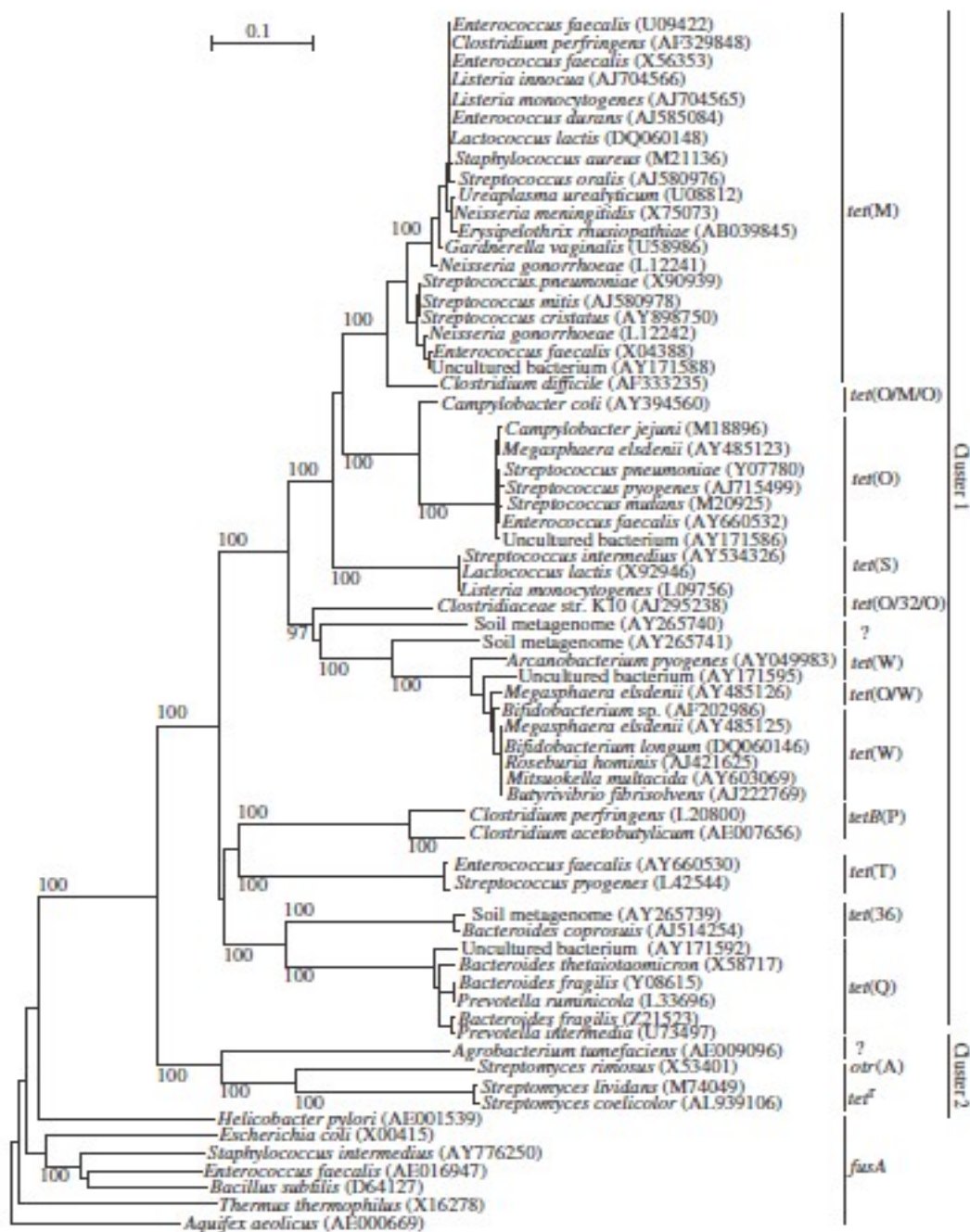


Figura 2.- Análisis filogenéticos de determinantes de resistencia encontrados en diferentes especies bacteriana.

La secuencia FusA de *Aquifex* es usada como grupo externo. (obtenido de ref. 101).

También ha podido demostrarse la movilización por conjugación del gen de eflujo *tet*(40), uno de los últimos en ser descubierto. Pudo transmitirse desde una cepa donadora de *Clostridium saccharolyticum* a *Roseburia intestinalis*, un receptor anaerobio comensal del tracto gastrointestinal humano. El elemento genético que lo transmite parece poseer regiones homólogas al operón VanG descrito en *Enterococcus faecalis*, tratándose probablemente de un transposón conjugativo. En dicho elemento, *tet*(40) aparece en tándem con el determinante *tet*(O/32/O), lo cual ha podido localizarse por análisis metagenómico en al menos otros 10 casos, lo cual indica la abundancia de

estos determinantes en las especies de este nicho ecológico (117). Otras formas recombinantes de *tet(O)* y *tet(32)* se han encontrado en *Bifidobacterium thermophilum* y *Lactobacillus johnsonii*, localizándose en su entorno genético inmediato al menos una transposasa.

El gen *tet(M)* aparece asociado a elementos conjugativos en *Veillonella parvula* así como en *Fusobacterium nucleatum*. Se encontró en al menos 10 especies diferentes de bacterias anaerobias Gram negativas el transposón Tn6009 (de la familia de Tn916), el cual portaba el gen *tet(M)* ligado a los genes *merA*, *merB*, *merR* y *merT* del operón *mer* de resistencia al mercurio inorgánico en *Staphylococcus aureus* (118).

El gen *tet(Q)*, primero descrito en *Bacteroides* y generalmente asociado con el gen de resistencia a eritromicina *erm(F)*, aparece especialmente distribuido en géneros de *Negativicutes* como *Mitsuokella*, *Selenomonas* y *Veillonella*. Asimismo, aparece en *Clostridium*, género de Gram-positivos muy relacionado con *Negativicutes*.

4. Transferencia génica horizontal en bacterias anaerobias.

La movilización y transferencia intercelular de los ácidos nucleicos (119) son procesos biológicos fundamentales estudiados en muy diversas especies. Con independencia de la naturaleza de cada elemento genético móvil particular, los procesos bioquímicos básicos en un evento de movilización y transferencia genética en bacterias son dos: en primer lugar, la formación de la maquinaria de movilización o relaxosoma, y en segundo lugar, el mecanismo físico de transferencia de ese ADN movilizado. La movilización del ADN se lleva a cabo por tres tipos principales de reacciones bioquímicas: la Recombinación Conservativa Específica de Sitio (RCES), la Transposición y la Integración Retroviral (típica de retrotransposones, y retrones bacterianos) (120).

En la RCES, las dos hebras de cada una de las dos moléculas de ADN a recombinar son cortadas en una posición específica, intercambiadas y religadas. Las enzimas recombinasas, que catalizan esta reacción, se clasifican como Serina-recombinasas (121) o Tirosina-recombinasas (122) dependiendo de si el intermediario covalente se establece por medio de un resto de fosfoerina o de fosfotirosina. Las serina-recombinasas catalizan el corte de las cuatro hebras implicadas antes de cualquier intercambio, mientras que las tirosina-recombinasas completan el corte, intercambio y religado de una de las parejas de hebras antes de comenzar con la otra pareja, formando transitoriamente una unión de Holliday. En ambos casos, cada copia del sitio de recombinación se posiciona flanqueando de forma simétrica una región central de secuencia corta, muchas veces asimétrica, conocida como *región de entrecruzamiento*. El intercambio de las hebras del ADN ocurre en los extremos de esta región. En la transposición (123), la enzima transposasa cataliza una transesterificación en dos pasos. Las transesterificaciones se diferencian en dos tipos: aquellas en que se impliquen dos intermediarios de ADN y las que implican intermediarios de ADN y ARN. Este último tipo no aparece en las bacterias.

Con respecto a los mecanismos de transferencia, entre las bacterias existen tres principales: la conjugación, la transducción mediada por bacteriófagos y la transformación genética. Todos los elementos genéticos conjugativos son autónomos y autotransferibles. En su secuencia se codifican todas las funciones necesarias para la transferencia del ADN, tanto el procesado inicial del mismo como la maquinaria de conjugación para su translocación. Por contra, los elementos genéticos móviles no conjugativos, solamente codifican las funciones de procesado del ADN. Requieren por lo general el empleo de la maquinaria de transferencia codificada en *trans* por algún elemento conjugativo co-residente (*elemento ayudante*).

En la Tabla 4 se presenta una breve clasificación de los grandes grupos de elementos genéticos móviles en bacterias, tomando como criterio los mecanismos bioquímicos generales que se acaban de exponer.

Mecanismo bioquímico	Elemento genético móvil
<i>Recombinación sitio-específica</i>	Transposones conjugativos (124).
	Basados en la integrasa del bacteriófago λ (125).
	Basados en la recombinasa XerC (126) de <i>E. coli</i> .
	Integrones.
	Transposones movilizables (Tn3 y derivados) (127).
<i>Transesterificación</i>	Secuencias de Inserción (128).*
	Transposición vía bacteriófago Mu (129).
	Transposones compuestos (Tn5 (130), Tn10 y derivados).
	Transposón complejo Tn7 y derivados.
<i>Otros mecanismos</i>	Intrones móviles (131, 132).

Tabla 4. Clasificación de los grandes grupos de elementos genéticos móviles en bacterias, tomando como criterio los mecanismos bioquímicos que posibilitan la movilización del ADN en cada caso. Nota: *Con excepción de la familia IS91, que utiliza el mecanismo de transposición mediante círculo rodante.

Como se ha señalado al comienzo de esta Tesis, el tracto gastrointestinal es un complejo ecosistema en el que coexisten más de 500 especies bacterianas con una densidad global de 10^{12} - 10^{14} bacterias/mL. La alteración de ese ecosistema probablemente estará relacionada con situaciones patológicas. El TGI humano es también un reservorio de genes de resistencia, que en este contexto debe ser entendido como un mecanismo de defensa comunitario. Desde el punto de vista de la ecología bacteriana, la presencia de un determinante de resistencia en un ambiente tan complejo tendrá un mayor valor selectivo si es compartido por un número elevado de miembros de ese ecosistema. En otras palabras, resulta plausible que en este ambiente la presencia de determinantes de resistencia antibiótica esté asociado a elementos móviles.

Las especies bacterianas más prevalentes en tracto gastrointestinal son las bacterias anaerobias, destacando especialmente *Bacteroides* y *Clostridium*. Es en estas dos especies donde más extensamente se han estudiado y caracterizado elementos móviles. La secuenciación de genomas completos ha permitido detectar que al menos el 11% del genoma de *C. difficile* está

constituido por elementos móviles (133), muchos de los cuales son portadores de determinantes de resistencia antibiótica. En este sentido, el rápido incremento de la resistencia antibiótica en especies del género *Bacteroides*, ha estado asociado a elementos móviles, como el incremento observado en las últimas décadas de la resistencia a tetraciclina desde el 30% hasta el 80% mediada por el gen *tet(Q)* asociado al transposón conjugativo cTnDOT, el cual también porta el determinante de resistencia a eritromicina *ermF*, a pesar de que éste no puede expresarse en *Bacteroides* (134).

Elemento genético	Descripción
PBF4, pBFTM10, pBI136	Plásmidos de 41, 15 y 80 Kb. Codifican resistencia a MLS* de alto nivel conferida por los genes <i>erm</i> .
Tn5030	Elemento tipo ERL. Transposón movilizable. Resistencia a MLS y tetraciclina.
Tn4399	Transposón capaz de movilizar plásmidos hacia <i>E. coli</i> .
CTnDOT	Principal transposón conjugativo de <i>Bacteroides</i> . Porta <i>tetQ</i> y <i>ermF</i> .
Tn916	Elementos tipo CtnDOT de enterococos presentes en aislados de <i>Bacteroides</i> .
NBU	<i>Non-replicating Bacteroides Units</i> . Al igual que Ctn, que los escinde y moviliza, se escinden para formar intermediarios circulares cerrados covalentemente.
Tn5520, Tn4555	Transposones movilizables. Se transfieren vía CnTn. Confieren resistencia a otros antibióticos, entre ellos los β -lactámicos.
CTnBST	Transposón conjugativo de 100 Kb. Porta el gen <i>ermB</i> .
CTn341	Familia de CTnDOT. Genes relacionados con metabolismo del ADN, conjugación y resistencia a los antibióticos.
cLV25	Transposón movilizable similar a Tn4399.

Tabla 5. Resumen de los elementos genéticos movilizables y conjugativos descritos en *Bacteroides* que portan algún determinante de resistencia antibiótica. Los elementos conjugativos (cTnDOT, cTn341, cTnBST, cTnGERM1, cTnERL, cTn86, cTn9343) son autónomos y autotransferibles, codificando todas las funciones necesarias para la transferencia del ADN. *MLS: Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas.

CTnDOT (65 Kb) fue primer transposón conjugativo descrito en bacterias Gram-negativas y el mejor estudiado hasta la fecha. De hecho, este transposón conjugativo (cTn) es un ejemplo paradigmático, ya que en ausencia de tetraciclina en el medio, no hay transferencia génica, pero en presencia de tetraciclina, no solo se induce la resistencia antibiótica mediada por el

producto del gen *tet(Q)*, además la tasa de transferencia se incrementa en 1.000-10.000 veces (135). Por eso los transposones conjugativos de *Bacteroides* fueron inicialmente conocidos como “actores de resistencia a tetraciclinas” (136).

Hoy en día, más del 80% de los *Bacteroidetes* portan algún tipo de transposón conjugativo, aunque, curiosamente, en algunos de ellos los determinantes de resistencia son tipo *erm*, como *ermB* o *ermG* (en cTnBST y cTnGERM1 respectivamente). En la tabla 5 se recogen algunos de los elementos genéticos móviles descritos en especies de *Bacteroides*.

Es de destacar que en *Bacteroides* se ha encontrado uno de los dos casos de transposón conjugativo quimérico (un transposón conjugativo insertado en otro): el CTn12256 (95). Otro interesante ejemplo de la dispersión de determinantes de resistencia mediada por elementos descritos en *Bacteroides* es la diseminación de la resistencia a cefoxitina mediada por el gen *cfxA* que forma parte del elemento movilizable no conjugativo Tn4555. El 80% de las especies de *Bacteroides* son resistentes a cefoxitina mediado por *cfxA* (137) y posteriormente el mismo determinante y elemento han sido descrito aislados de *Prevotella* (138). Este transposón tiene un mecanismo de recombinación sitio específica similar a Tn916 (139, 140), el primer transposón conjugativo descrito en una bacteria Gram-positiva, *Enterococcus faecalis* (141). Probablemente *Bacteroides* y *Enterococcus* son las dos especies bacterianas donde más frecuentemente se han descrito transposones conjugativos.

Las características particulares (142) de los transposones conjugativos de *Bacteroides* que no están presentes en los de Gram positivos son la habilidad para insertarse en plásmidos corresidentes y movilizarlos en *cis*, la capacidad para escisionar elementos integrados no ligados y un sistema regulador capaz de responder a los niveles de tetraciclina y controlar en consecuencia las funciones de transferencia del elemento. Es de destacar que en *Bacteroides* se ha encontrado uno de los dos casos de transposón conjugativo quimérico (un TC insertado en otro): el CTn12256 (143) El otro caso es Tn5253 de *Streptococcus* (un Gram-positivo). En cuanto a los plásmidos conjugativos, se han caracterizado pBF4 (de *B. fragilis*, 41 Kb) y pBI136 (144) (*B. ovatus*, 80,6 Kb), así como el plásmido movilizable no conjugativo pLV22a (*B. fragilis*). Es interesante la presencia en *Bacteroides* de plásmidos *crípticos* de bajo peso molecular, que son plásmidos (entre 2 y 6 Kb) que no codifican ningún gen de resistencia a antibióticos, virulencia, ni ninguna otra función biológica obvia, tan solo las funciones de replicación, movilización y estabilidad del plásmido (ej.: pBI143 (145), de 2,7 Kb o pB8-51, de 4,2 Kb). Su capacidad de adquisición de uno o más determinantes de resistencia a antibióticos hacen de estos elementos evidente objeto de interés clínico. Existen,

además, elementos como los NBU (146) (nonreplicating *Bacteroides* units), que son elementos integrados de entre 10-12 kb., y que pueden escindirse y movilizarse en *trans* por transposones conjugativos inducibles por tetraciclina. El más estudiado de estos elementos es NBU1, el cual posee la integrasa *intN1*, perteneciente a la familia de las integrasas específicas de sitio del fago λ . Únicamente esta integrasa y la región de integración *attN1* son necesarias y suficientes para la integración.

Entre los grupos de anaerobios mejor estudiados y más representados en el tracto gastrointestinal, el género *Clostridium*, y en general los *Clostridiales*, se cuentan entre los más cercanos a *Acidaminococcus*. No en vano, hasta hace pocos años (54) y desde su descubrimiento en 1968, el género *Acidaminococcus* se contaba entre los *Clostridiales*. Es un ejemplo de especie no monofilética donde los eventos de transferencia horizontal han desligado la taxonomía de la filogenia (95, 147).

De particular interés resultan los fenómenos de transferencia génica horizontal en *Clostridium botulinum*, agente etiológico del botulismo, donde la presencia y transmisión provoca numerosos eventos de TGH, que han sido demostrados, los cuales se producen merced tanto a plásmidos conjugativos portadores de la toxina botulínica como pBotCDC-A3, pCLJ o pCLL, plásmidos movilizables y Secuencias de Inserción, entre los elementos cromosómicos. (148) El complejo, compuesto de la neurotoxina y diferentes elementos asociados, codificado por el *cluster* genético *bont* está sujeto a TGH, siendo la causa de la diversidad genética y los diferentes grupos que desde el punto de vista fisiológico (I-IV) existen en *Clostridium botulinum*. En concreto, el Grupo III (149) contiene un número especialmente elevado de plásmidos movilizables, así como se ha comprobado la TGH desde este grupo hacia otros dentro de *C. botulinum*, así como entre otras especies de *Clostridium*. Los genes que codifican las diferentes toxinas (parece que tanto la toxina tetánica como la toxina botulínica y otras presentes en el grupo proceden de un hipotético ancestro común) aparecen en los diferentes grupos tanto en plásmidos (como por ejemplo p2BKT015925 y p3BKT015925) como en localizaciones cromosómicas. En el genoma de la cepa BKT015925, los elementos genéticos móviles constituyen el 3,4% de la secuencia. Las Secuencias de Inserción, constituyen en el grupo entre el 8 y el 12%.

Diferentes estudios ilustran la promiscuidad en cuanto a TGH en *Clostridium*, tanto *in vivo* como en experimentos *in vitro*. (150, 151). Se ha comprobado la presencia y movilización de muy diversos elementos genéticos, como los elementos tipo CTn (CTn1 a CTn6), en su mayoría transposones conjugativos, y sus derivados (sobre todo derivados de CTn1). También otros

elementos como Tn5397, Tn5398, Tn6103, Tn6110, etc., portadores de resistencias a eritromicina o tetraciclina. Es interesante el gran tamaño que presentan los elementos tipo Ctn, los cuales oscilan entre las 10 y las 80 Kb. de longitud.

Por su tamaño y su mecanismo de movilización, merecen especial interés los transposones Tn5397, Tn4451 y Tn4453, portadores de determinantes resistencia a cloranfenicol (*catP*). Tn5397 puede transferirse de *C. difficile* a *B. subtilis* y de nuevo volver a *C. difficile*. Es similar a Tn916 salvo, como se acaba de indicar, en mecanismo de movilización, en concreto en la naturaleza de su recombinasa. Se trata de la resolvasa de gran tamaño (entorno a 2 Kb.) TndX, la cual es necesaria y suficiente para la excisión e integración de Tn5397. Cataliza una integración sitio-específica, con formación de un intermediario circular (de modo similar al mecanismo del Fago λ) dejando como marca el dinucleótido GA, presente en la secuencia diana reconocida por la enzima. Por su parte, TnpX es la recombinasa del transposón Tn4451. También de gran tamaño, cataliza la excisión, de nuevo de un intermediario circular. Su dominio resolvasa y no su dominio integrasa es esencial para la excisión y la integración. La regulación de la transposición se lleva a cabo tras la unión de los extremos en el intermediario circular, lo que permite constituir un promotor activo que determina la expresión de *tnpX*. Tn4451 posee también el gen *tnpZ*, que codifica para una proteína tipo Mob, de movilización en transposones conjugativos, localizado junto a *tnpX*. Esta proteína actúa en el oriT localizado en el transposón y, en presencia de un elemento conjugativo corresidente, promueve el movimiento del intermediario circular no replicativo y del plásmido en el cual el transposón reside (152, 153, 154, 155, 156).

Los bacteriófagos atemperados o defectivos, en forma de profagos (157), son elementos importantes en el genoma de grupos bacterianos diversos. Lo son tanto cuantitativamente, por el elevado porcentaje del genoma que suponen, como por su actividad como elementos de transferencia génica horizontal o por aportar módulos génicos que posibilitan dicho proceso. Los ciclos de infección de las bacterias por parte de los bacteriófagos en la naturaleza hace que estas experimenten variaciones con respecto a su composición fágica en sus genomas. Los genomas bacterianos se mantienen en un estado estacionario, determinado por la tasa de infección, de decaimiento del profago y de pérdida del mismo. Los recientes estudios de comparación entre los genomas de diferentes cepas dentro de la misma especie reflejan la dinámica de los genomas en este sentido (158).

Especial mención merecen aquí los profagos de los géneros *Bacillus* y de *Clostridium*. El sifovirus SPP1 y el podovirus phi29 se cuentan entre los más estudiados en *Bacillus*. Los fagos

atemperados son mucho menos conocidos en este género, existiendo tan solo algunos grupos secuenciados. De especial interés es el Grupo V, que contiene los profagos PBSX y skin. Estos profagos actúan, tras su inducción con luz UV o mitomicina C, de un modo similar a las bacteriocinas, generando partículas que constan de una pequeña cabeza y una cola grande y compleja, adsorbiéndose a bacterias similares y matándolas. La cabeza contiene 13 Kb. de fragmentos seleccionados al azar en el cromosoma. PBSX es incapaz de inyectar el ADN contenido en su cabeza a otras bacterias. No obstante, no es posible curar este profago de una cepa de *B. subtilis*, por lo que se especula que su mantenimiento continúa siendo ventajoso, si no esencial, para la célula. Skin, por el contrario, no posee genes esenciales y puede ser eliminado. Se han encontrado elementos similares a PBSX en cepas tan distantes como *Listeria innocua*, con profagos muy similares (como el Profago 2 de dicha especie). Este dato apunta a su importancia fisiológica y su posible función como elemento activo en la TGH.

En cuanto a *Clostridium*, existe en la cepa E88 de *Clostridium tetani* un profago (phiCT3) que es un híbrido entre PBSX y los fagos 3626 y Sfi21. El fago PhiCT2, poseedor de las integrasas SPBc2 (un fago también típico de *Bacillus subtilis*) y A118, abunda también en el género. Experimentos con hoy más de 30 años demostraron que fagos lisogénicos eran capaces de convertir cepas no toxigénicas en toxigénicas. Fagos como Phi3626, la mayoría de la familia Siphoviridae, abundan en *Clostridium* y se sabe que intervienen en la toxigenicidad, como se acaba de indicar, o la capacidad de esporulación de la cepa. El Profago 1 de *Clostridium acetobutylicum* (similar a Sfi21 y a profagos de *S. aureus*), termina con dos resolvasas en tándem, responsables de su movilización (159, 160).

El estudio comparado de los profagos presentes en los genomas bacterianos ha permitido inferir algunos principios en relación a su comportamiento evolutivo. En primer lugar se favorece la lisogenia frente al ciclo lítico, como demuestra la gran conservación de los sitios de integración del profago. Ocupan *loci* genómicos íntimamente relacionados con los patrones de expresión génica y la estructura del cromosoma. Además, se favorece la conservación de dominios exclusivos de la biología de los fagos. Resulta notorio que los bacteriófagos están influyendo de manera lateral en la evolución de los genomas bacterianos, constituyendo así una fuente de variabilidad por transferencia génica horizontal de primer orden.

4.1. Elementos móviles en *Negativicutes*.

Selenomonas, *Veillonella* y *Megasphaera* son los órdenes más estudiados en la clase *Negativicutes*. En los últimos años, este grupo ha experimentado un crecimiento notable en la cantidad de información registrada en las bases de datos. En el momento de la impresión de esta Tesis, el número de genomas secuenciados en la clase es de 43. En el momento de iniciarse, apenas se contaban con 2 genomas tan solo parcialmente secuenciados. Este incremento se debe en parte al esfuerzo en la secuenciación de los microorganismos de la flora bacteriana realizado por el Proyecto Microbioma Humano. Por otro lado, es creciente el interés en esta clase tan peculiar, por motivos ya expuestos anteriormente en esta Introducción, y especialmente por su interés como posibles reservorios de determinantes de resistencia a los antibióticos.

En *Veillonella* (161), género de anaerobios Gram-negativos presentes en el TGI, parece ser uno de estos reservorios, especialmente de genes de resistencia a tetraciclina. Estos genes se encuentran en transposones conjugativos, cuya transferencia horizontal ha sido probada *in vitro*, utilizándose bacterias del género *Streptococcus* como receptoras, utilizándose el transposón conjugativo Tn916 (162, 163). En la cavidad oral, *Veillonella* podría constituir un importante reservorio de resistencias. En biofilms duales formados por *Veillonella parvula* y de *Streptococcus mutans*, se ha comprobado que la segunda ve alterada su fisiología por la convivencia con la primera, al recibir de esta determinantes de resistencia que le permiten sobrevivir al tratamiento con antimicrobianos (164).

En cuanto a *Selenomonas*, se han realizado algunos estudios con *Selenomonas ruminantium* en el tracto gastrointestinal de rumiantes que indican que las poblaciones de esta especie en este nicho tienen una estructura genética compleja (165). Los plásmidos (pSRD191 es el más estudiado de los 6 que poseen) presentes en esta especie parecen diferir de manera importante en su secuencia, postulándose que los procesos de recombinación están jugando un papel importante en su evolución y diseminación (166).

Megasphaera es uno de los órdenes dentro de los *Negativicutes* con mayor número de publicaciones, en parte debido a la profusión de artículos relacionados con estudios sobre las propiedades redox de sus flavoproteínas. En cuanto a su papel en transferencia génica horizontal, se da la circunstancia de que se han descubierto diferentes patrones de resistencia a los antibióticos, fundamentalmente determinantes de resistencia a tetraciclina (167, 168). No obstante, parece que la estructura genética de las especies del género es bastante estable, con una variabilidad limitada, lo

cual contrasta con lo anteriormente expuesto (169). El estudio de los mecanismos de diseminación que puedan existir en *Megasphaera* parece un tema de investigación prometedor en el futuro cercano.

Dialister, género relacionado con patologías de la cavidad oral como la periodontitis, parece poseer diversos determinantes de resistencia, si bien no se han estudiado en profundidad sus mecanismos de diseminación (170). En similar situación se encuentra la investigación con respecto a la TGH en otros géneros de la clase, tales como *Mitsuokella*, *Phascolarctobacterium*, *Acetoneuma*, *Centipeda* o *Sporomusa*. Son géneros en los cuales están empezando a aparecer, de manera creciente, datos sobre su secuencia genómica, los cuales permiten descubrir o complementar los estudios hasta el momento realizados en algunas de ellas, que generalmente son de tres tipos: estudios epidemiológicos y de poblaciones, de resistencia a los antibióticos en pocos casos, algunos estudios concretos sobre su metabolismo, y, sobre todo, un aspecto que en todos ellos llamaban la atención, las ya mencionadas características fenotípicas de su membrana discordantes con su naturaleza genética (171, 172). No obstante, hasta el momento no existen estudios sobre los mecanismos de TGH en estos géneros.

5. Referencias

- 1.- Davies JE. *Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants*. 1997. Ciba F Symp 207: 15–27; discussion 27–35.
- 2.- Martinez JL, Baquero F y Andersson DI. *Predicting antibiotic resistance*. 2007. Nat Rev Microbiol 5: 958–965.
- 3.- Nicholas RA, Strominger JL. *Relations between beta-lactamases and penicillin-binding proteins: beta-lactamase activity of penicillin-binding protein 5 from Escherichia coli*. 1988. Rev Infect Dis. 10(4):733-8.
- 4.- Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares JF, Martínez-Solano L, Sánchez MB. *A global view of antibiotic resistance*. 2009. FEMS Microbiol Rev. 33(1):44-65.
- 5.- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. *Antibiotic resistance is ancient*. 2011. Nature. 477(7365):457-61.
- 6.- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. *CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance*. 2013. Int J Med Microbiol. S1438-4221(13)00023-4.
- 7.- Livermore DM. *Epidemiology of antibiotic resistance*. 2000. Intensive Care Med. 26 Suppl 1:S14-21.
- 8.- Grice EA, Segre JA. *The human microbiome: our second genome*. 2012. Annu Rev Genomics Hum Genet. 13:151-70.
- 9.- Baquero F. *Metagenomic epidemiology: a public health need for the control of antimicrobial resistance*. 2012. Clin Microbiol Infect. 4:67-73.
- 10.- Baquero F, Nombela C. *The microbiome as a human organ*. 2012. Clin Microbiol Infect. 4:2-4.
- 11.- Robertson CE, Harris JK, Spear JR, Pace NR. *Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea*. 2005. Curr Opin Microbiol. 8(6):638-42.
- 12.- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. *Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly*. 2012. Nature. 488(7410):178-84.
- 13.- Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. *Human gut microbiome viewed across age and geography*. 2012. Nature. 486(7402):222-7.

- 14.- Weinstock GM. *The volatile microbiome*. 2011. *Genome Biol.* 12(5):114.
- 15.- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. *Diversity of the human intestinal microbial flora*. 2005. *Science.* 308(5728):1635-8.
- 16.- Cho I, Blaser MJ. *The human microbiome: at the interface of health and disease*. 2012. *Nat Rev Genet.* 13(4):260-70.
- 17.- Madan JC, Koestler DC, Stanton BA, Davidson L, Moulton LA, Housman ML, Moore JH, Guill MF, Morrison HG, Sogin ML, Hampton TH, Karagas MR, Palumbo PE, Foster JA, Hibberd PL, O'Toole GA. *Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures*. 2012. *MBio.* 3(4).
- 18.- Cho I, Blaser MJ. *The human microbiome: at the interface of health and disease*. 2012. *Nat Rev Genet.* 13(4):260-70.
- 19.- Koren O, Knights D, Gonzalez A, Waldron L, Segata N, Knight R, Huttenhower C, Ley RE. *A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets*. 2013. *PLoS Comput Biol.* 9(1):e1002863.
- 20.- Kåhrström CT. *Evolution: Converging on divergence*. 2012. *Nat Rev Genet.* 13(6):380.
- 21.- Arifuzzaman M, Maeda M, Itoh A, Nishikata K, Takita C, Saito R, Ara T, Nakahigashi K, Huang HC, Hirai A, Tsuzuki K, Nakamura S, Altaf-Ul-Amin M, Oshima T, Baba T, Yamamoto N, Kawamura T, Ioka-Nakamichi T, Kitagawa M, Tomita M, Kanaya S, Wada C, Mori H. *Large-scale identification of protein-protein interaction of Escherichia coli K-12*. 2006. *Genome Res.* 16(5):686-91.
- 22.- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. 2010. *Nature.* 464(7285):59-65.
- 23.- Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, Bittar F, Fournous G, Gimenez G, Maraninchi M, Trape JF, Koonin EV, La Scola B, Raoult D. *Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study*. 2012. *Clin Microbiol Infect.* 18(12):1185-93.
- 24.- Martínez JL. *Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments*. 2008. *Science.* 321(5887):365-7.

- 25.- Selden R, Lee S, Wang WL, Bennett JV, Eickhoff TC. *Nosocomial klebsiella infections: intestinal colonization as a reservoir*. 1971. *Ann Intern Med*. 74(5):657-64.
- 26.- Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. *Evidence for extensive resistance gene transfer among Bacteroides spp. and among Bacteroides and other genera in the human colon*. 2001. *Appl Environ Microbiol*. 67(2):561-8.
- 27.- Karami N, Martner A, Enne VI, Swerkersson S, Adlerberth I, Wold AE. *Transfer of an ampicillin resistance gene between two Escherichia coli strains in the bowel microbiota of an infant treated with antibiotics*. 2007. *J Antimicrob Chemother*. 60(5):1142-5.
- 28.- Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO, Dantas G. *The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens*. 2012. *Science*. 337(6098):1107-11.
- 29.- Dantas G, Sommer MO. *Context matters - the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes*. 2012. *Curr Opin Microbiol*. 15(5):577-82.
- 30.- Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Barton HA, Wright GD. *Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome*. 2012. *PLoS One*. 7(4):e34953.
- 31.- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. *Sampling the antibiotic resistome*. 2006. *Science*. 311(5759):374-7.
- 32.- Fajardo A, Martínez-Martín N, Mercadillo M, Galán JC, Ghysels B, Matthijs S, Cornelis P, Wiehlmann L, Tümmler B, Baquero F, Martínez JL. *The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens*. 2008. *PLoS One*. 3(2):e1619.
- 33.- Sommer MO, Dantas G, Church GM. *Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora*. 2009. *Science*. 325(5944):1128-31.
- 34.- Salyers A, Shoemaker NB. *Reservoirs of antibiotic resistance genes*. 2006. *Anim Biotechnol*. 17(2):137-46.
- 35.- Sommer MO, Church GM, Dantas G. *The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes*. 2010. *Virulence*. 1(4):299-303.
- 36.- Sommer MO, Dantas G. *Antibiotics and the resistant microbiome*. 2011. *Curr Opin Microbiol*. 14(5):556-63.
- 37.- Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, Alm EJ. *Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome*. 2011. *Nature*. 480(7376):241-4.
- 38.- Baquero F. *Metagenomic epidemiology: a public health need for the control of antimicrobial resistance*. 2012. *Clin Microbiol Infect*. 18 Suppl 4:67-73.

- 39.- Dethlefsen L, Relman DA. *Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation*. 2011. Proc Natl Acad Sci U S A. 108 Suppl 1:4554-61.
- 40.- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. *Diversity of the human intestinal microbial flora*. 2005. Science. 308(5728):1635-8.
- 41.- Mizuuchi K., Baker T.A. *Chemical mechanisms for mobilizing DNA*. Mobile DNA II, edited by N. L. Craig *et al*. 2002 ASM Press.
- 42.- Craig NL. *The mechanism of conservative site-specific recombination*. 1988. Annu Rev Genet. 22:77-105.
- 43.- Sadowski PD. *Site-specific genetic recombination: hops, flips, and flops*. 1993. FASEB J. 7(9):760-7.
- 44.- Bennett PM. *Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement*. 2004. Methods Mol Biol. 266:71-113.
- 45.- Inouye M, Inouye S. *Retroelements in bacteria*. 1991. Trends Biochem Sci. 16(1):18-21.
- 46.- Smith M.C.M., Thorpe H.M. *Diversity in the serine recombinases*. 2002. Mol Microbiol. 44, 2: 299–307.
- 47.- Dantas G, Sommer MO. *Context matters - the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes*. 2012. Curr Opin Microbiol. 15(5):577-82.
- 48.- Both B, Buckel W, Kroppenstedt R, Stackebrandt E. *Phylogenetic and chemotaxonomic characterization of Acidaminococcus fermentans*. 1992. FEMS Microbiol Lett. 76(1-2):7-11.
- 49.- Rogosa M. *Acidaminococcus gen. n., Acidaminococcus fermentans sp. n., anaerobic gram-negative diplococci using amino acids as the sole energy source for growth*. 1969. J Bacteriol. 98(2):756-66.
- 50.- Jumas-Bilak E, Carlier JP, Jean-Pierre H, Mory F, Teyssier C, Gay B, Campos J, Marchandin H. *Acidaminococcus intestini sp. nov., isolated from human clinical samples*. 2007. Int J Syst Evol Microbiol. 57(Pt 10):2314-9.
- 51.- Marchandin H, Teyssier C, Campos J, Jean-Pierre H, Roger F, Gay B, Carlier JP, Jumas-Bilak E. *Negativicoccus succinicivorans gen. nov., sp. nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family Veillonellaceae and description of Negativicutes classis nov., Selenomonadales ord. nov. and Acidaminococcaceae fam. nov. in the bacterial phylum Firmicutes*. 2010. Int J Syst Evol Microbiol. 60(Pt 6):1271-9.
- 52.- Mavromatis K, Ivanova N, Anderson I, Lykidis A, Hooper SD, Sun H, Kunin V, Lapidus A, Hugenholtz P, Patel B, Kyrpides NC. *Genome analysis of the anaerobic thermohalophilic bacterium Halothermothrix orenii*. 2009. PLoS One. 4(1):e4192.

- 53.- Beveridge TJ. *Use of the gram stain in microbiology*. 2001. Biotech Histochem. 76(3):111-8.
- 54.- Lake JA. *Evidence for an early prokaryotic endosymbiosis*. 2009. Nature. 460(7258):967-71. doi: 10.1038/nature08183.
- 55.- Gupta RS. *Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes*. 2011. Antonie Van Leeuwenhoek. 2011. 100(2):171-82.
- 56.- Vollmer W. *Bacterial outer membrane evolution via sporulation?* 2011. Nat Chem Biol. 8(1):14-8.
- 57.- Tocheva EI, Matson EG, Morris DM, Moussavi F, Leadbetter JR, Jensen GJ. *Peptidoglycan remodeling and conversion of an inner membrane into an outer membrane during sporulation*. 2011. Cell. 146(5):799-812.
- 58.- Lombard J, López-García P, Moreira D. *The early evolution of lipid membranes and the three domains of life*. 2012. Nat Rev Microbiol. 10(7):507-15.
- 59.- Lake JA, Skophammer RG, Herbold CW, Servin JA. *Genome beginnings: rooting the tree of life*. 2009. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 364(1527):2177-85.
- 60.- Gupta RS. *Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes*. 2011. Antonie Van Leeuwenhoek. 100(2):171-82.
- 61.- Fajardo A, Martínez-Martín N, Mercadillo M, Galán JC, Ghysels B, Matthijs S, Cornelis P, Wiehlmann L, Tümmler B, Baquero F, Martínez JL. *The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens*. 2008. PLoS One. 3(2):e1619.
- 62.- Nielsen H, Johansen SD. *Group I introns: Moving in new directions*. 2009. RNA Biol. 6(4):375-83.
- 63.- Salyers AA, Gupta A, Wang Y. *Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes*. 2004. Trends Microbiol. 12(9):412-6.
- 64.- Sommer MO, Dantas G, Church GM. *Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora*. 2009. Science. 325(5944):1128-31.
- 65.- De Vries LE, Vallès Y, Agersø Y, Vaishampayan PA, García-Montaner A, Kuehl JV, Christensen H, Barlow M, Francino MP. *The gut as reservoir of antibiotic resistance: microbial diversity of tetracycline resistance in mother and infant*. 2011. PLoS One. 6(6):e21644.
- 66.- Vedantam G. *Antimicrobial resistance in Bacteroides spp.: occurrence and dissemination*. 2009. Future Microbiol.

4(4):413-23.

67.- Baquero F, Reig M. *Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in Spain*. 1992. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 11(11):1016-20.

68.- Marchandin H, Jean-Pierre H, Campos J, Dubreuil L, Teyssier C, Jumas-Bilak E. *nimE gene in a metronidazole-susceptible Veillonella sp. strain*. 2004. Antimicrob Agents Chemother. 48(8):3207-8.

69.- Morio F, Jean-Pierre H, Dubreuil L, Jumas-Bilak E, Calvet L, Mercier G, Devine R, Marchandin H. *Antimicrobial susceptibilities and clinical sources of Dialister species*. 2007. Antimicrob Agents Chemother. 51(12):4498-501.

70.- Reig M, Calderón C, Baquero F. *Resistance of veillonella to hydrosoluble pristinamycins: a possible outer membrane barrier effect*. 1995. Anaerobe. 1995 1(2):93-6.

71.- Piriz S, Cuenca R, Valle J, Vadillo S. *Susceptibilities of anaerobic bacteria isolated from animals with ovine foot rot to 28 antimicrobial agents*. 1992. Antimicrob Agents Chemother. 36(1):198-201.

72.- Reig M, Mir N, Baquero F. *Penicillin resistance in Veillonella*. 1997. Antimicrob Agents Chemother. 41(5):1210.

73.- Galán JC, Reig M, Navas A, Baquero F, Blázquez J. *ACI-1 from Acidaminococcus fermentans: characterization of the first beta-lactamase in Anaerobic cocci*. 2000. Antimicrob Agents Chemother. 44(11):3144-9.

74.- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*. 1995. Antimicrob Agents Chemother. 39(6):1211-33.

75.- Galán JC. *Trans-gram gene transfer: the case of beta-lactamases*. 2002. Rev Esp Quimioter. 15(3):215-23.

76.- Reig M, Mir N, Baquero F. *Penicillin resistance in Veillonella*. 1997. Antimicrob Agents Chemother. 41(5):1210.

77.- Theron MM, van Rensburg MN, Chalkley LJ. *Penicillin-binding proteins involved in high-level piperacillin resistance in Veillonella spp*. 2003. J Antimicrob Chemother. 52(1):120-2.

78.- Sutter VL, Finegold SM. *Susceptibility of anaerobic bacteria to 23 antimicrobial agents*. 1976. Antimicrob Agents Chemother. 10(4):736-52.

79.- Lubbe MM, Botha PL, Chalkley LJ. *Comparative activity of eighteen antimicrobial agents against anaerobic bacteria isolated in South Africa*. 1999. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 18(1):46-54.

80.- Ready D, Bedi R, Mullany P, Wilson M. *Penicillin and amoxicillin resistance in oral Veillonella spp*. 2012. Int J Antimicrob Agents. 40(2):188-9.

- 81.- Piriz S, Cuenca R, Valle J, Vadillo S. *Susceptibilities of anaerobic bacteria isolated from animals with ovine foot rot to 28 antimicrobial agents*. 1992. Antimicrob Agents Chemother. 36(1):198-201.
- 82.- Bush K. *Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases*. 2013. Ann N Y Acad Sci. 1277:84-90.
- 83.- Llanes C, Kirchgesner V, Plesiat P. *Propagation of TEM- and PSE-type beta-lactamases among amoxicillin-resistant Salmonella spp. isolated in France*. 1999. Antimicrob Agents Chemother. ;43(10):2430-6.
- 84.- Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. *Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria*. 1999. J Antimicrob Chemother. 44(3):309-18.
- 85.- Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. *Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a Salmonella typhimurium clone expressing an integron-borne OXA-30 beta-lactamase*. 2004. J Antimicrob Chemother. 54(2):429-34.
- 86.- Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Goldstein EJ, Harrell L, Jenkins S, Newton D, Pierson C, Rosenblatt J, Venezia R, Gorbach SL, Queenan AM, Hecht DW. *Update on resistance of Bacteroides fragilis group and related species with special attention to carbapenems*. 2006-2009. 2011. Anaerobe. 17(4):147-51.
- 87.- Lambowitz AM, Zimmerly S. *Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA*. 2011. Cold Spring Harb Perspect Biol. 3(8):a003616.
- 88.- Roberts MC. *Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution*. 1996. FEMS Microbiol Rev. 19(1):1-24.
- 89.- Franke AE, Clewell DB. *Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in Streptococcus faecalis that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid*. 1981. J Bacteriol. 145(1):494-502.
- 90.- Roberts AP, Mullany P. *Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance*. 2011. FEMS Microbiol Rev. 35(5):856-71.
- 91.- Whittle G, Shoemaker NB, Salyers AA. *Characterization of genes involved in modulation of conjugal transfer of the Bacteroides conjugative transposon CTnDOT*. 2002. J Bacteriol. 184(14):3839-47.
- 92.- Nguyen M., Vedantam G. *Mobile genetic elements in the genus Bacteroides, and their mechanism(s) of dissemination*. 2011. Mob Genet Elements. 1(3): 187–196.
- 93.- Smith C.J. *Characterization of Bacteroides ovatus plasmid pBI136 and structure of its clindamycin resistance region*. 1985. J Bacteriol. 161(3): 1069–1073.
- 94.- Smith C. J., Rollins L.A., Parker A.C. *Nucleotide sequence determination and genetic analysis of the Bacteroides*

plasmid, *pBII43*. 1995. Plasmid 34:211–222.

95.- Shoemaker NB, Wang GR, Salyers AA. *Multiple gene products and sequences required for excision of the mobilizable integrated Bacteroides element*. 2000. J Bacteriol. 182(4):928-36.

96.- Skarin H, Segerman B. *Horizontal gene transfer of toxin genes in Clostridium botulinum: Involvement of mobile elements and plasmids*. 2011. Mob Genet Elements. 1(3): 213–215.

97.- Skarin H., Häfström T., Westerberg J., Segerman B. *Clostridium botulinum group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements*. 2011. BMC Genomics. 12: 185.

98.- Domingo M.-C., Huletsky A., Giroux R., Picard F. J., Bergeron M. G. *Naturally Occurring DNA Transfer System Associated with Membrane Vesicles in Cellulolytic Ruminococcus spp. of Ruminal Origin*. 2007. Antimicrob Agents Chemother. 51(11): 4111–4117.

99.- Billington SJ, Jost BH. *Multiple Genetic Elements Carry the Tetracycline Resistance Gene tet(W) in the Animal Pathogen Arcanobacterium pyogenes*. 2006. Antimicrob Agents Chemother. 50(11):3580-7.

100.- Ready D, Pratten J, Roberts AP, Bedi R, Mullany P, Wilson M. *Potential role of Veillonella spp. as a reservoir of transferable tetracycline resistance in the oral cavity*. 2006. Antimicrob Agents Chemother. 50(8):2866-8.

101.- Kazimierczak KA, Scott KP, Kelly D, Aminov RI. *Tetracycline resistome of the organic pig gut*. 2009. Appl Environ Microbiol. 75(6):1717-22.

102.- Kazimierczak KA, Rincon MT, Patterson AJ, Martin JC, Young P, Flint HJ, Scott KP. *A new tetracycline efflux gene, tet(40), is located in tandem with tet(O/32/O) in a human gut firmicute bacterium and in metagenomic library clones*. 2008. Antimicrob Agents Chemother. 52(11):4001-9.

103.- Colmore JP, Braden B, Wilkerson R. *Effectiveness of doxycycline treatment in chronic urinary tract infections*. 1966. Antimicrob Agents Chemother (Bethesda). 6:118-20.

104.- Stanton TB, Humphrey SB. *Isolation of tetracycline-resistant Megasphaera elsdenii strains with novel mosaic gene combinations of tet(O) and tet(W) from swine*. 2003. Appl Environ Microbiol. 69(7):3874-82.

105.- Manavathu EK, Hiratsuka K, Taylor DE. *Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline-resistance gene from Campylobacter jejuni*. 1988. Gene. 62(1):17-26.

106.- Roberts MC. *Epidemiology of tetracycline-resistance determinants*. 1994. Trends Microbiol. 2(10):353-7.

107.- Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. *Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance*. 2003. Antimicrob Agents Chemother. 47(12):3675-81.

- 108.- Butaye P, Cloeckert A, Schwarz S. *Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria*. 2003. *Int J Antimicrob Agents*. 22(3):205-10.
- 109.- Kobayashi T, Nonaka L, Maruyama F, Suzuki S. *Molecular evidence for the ancient origin of the ribosomal protection protein that mediates tetracycline resistance in bacteria*. 2007. *J Mol Evol*. 65(3):228-35.
- 110.- Ready D, Pratten J, Roberts AP, Bedi R, Mullany P, Wilson M. *Potential role of Veillonella spp. as a reservoir of transferable tetracycline resistance in the oral cavity*. 2006. *Antimicrob Agents Chemother*. 50(8):2866-8.
- 111.- Giovanetti E, Brenciani A, Bacciaglia A, Montanari MP, Varaldo PE. *Expressed and unexpressed tet(M) genes and the erm(B)-carrying Tn1116 transposon in Streptococcus pyogenes and Streptococcus pneumoniae*. 2007. *Antimicrob Agents Chemother*. 51(12):4535.
- 112.- Scott KP, Melville CM, Barbosa TM, Flint HJ. *Occurrence of the new tetracycline resistance gene tet(W) in bacteria from the human gut*. 2000. *Antimicrob Agents Chemother*. 44(3):775-7.
- 113.- Kazimierczak KA, Flint HJ, Scott KP. *Comparative analysis of sequences flanking tet(W) resistance genes in multiple species of gut bacteria*. 2006. *Antimicrob Agents Chemother*. 50(8):2632-9.
- 114.- Warburton P, Roberts AP, Allan E, Seville L, Lancaster H, Mullany P. *Characterization of tet(32) genes from the oral metagenome*. 2009. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(1):273-6.
- 115.- Stanton TB, Humphrey SB. *Isolation of tetracycline-resistant Megasphaera elsdenii strains with novel mosaic gene combinations of tet(O) and tet(W) from swine*. 2003. *Appl Environ Microbiol*. 69(7):3874-82.
- 116.- Stanton TB, McDowall JS, Rasmussen MA. *Diverse tetracycline resistance genotypes of Megasphaera elsdenii strains selectively cultured from swine feces*. 2004. *Appl Environ Microbiol*. 70(6):3754-7.
- 117.- Kazimierczak KA, Rincon MT, Patterson AJ, Martin JC, Young P, Flint HJ, Scott KP. *A new tetracycline efflux gene, tet(40), is located in tandem with tet(O/32/O) in a human gut firmicute bacterium and in metagenomic library clones*. 2008. *Antimicrob Agents Chemother*. 52(11):4001-9.
- 118.- Soge OO, Beck NK, White TM, No DB, Roberts MC. *A novel transposon, Tn6009, composed of a Tn916 element linked with a Staphylococcus aureus mer operon*. 2008. *J Antimicrob Chemother*. 62(4):674-80.
- 119.- Craig N.L. *Mobile DNA: an introduction*. Mobile DNA II, edited by N. L. Craig *et al*. 2002 ASM Press.
- 120.- Inouye M, Inouye S. *Retroelements in bacteria*. 1991. *Trends Biochem Sci*. 16(1):18-21.
121. Smith M.C.M., Thorpe H.M. *Diversity in the serine recombinases*. 2002. *Mol Microbiol*. 44(2):299-307.

- 122.- Lee L, Sadowski PD. *Strand selection by the tyrosine recombinases*. 2005. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 80:1-42.
- 123.- Polard P., Chandler M. *Bacterial transposases and retroviral integrases*. 1995. Molec. Microbiol. 15(1), 13-23
- 124.- Salyers A.A., Shoemaker N.B., Stevens A.M., Lhing-Yew L. *Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements*. 1995. Microbiological Reviews. Vol. 59, No. 4 p. 579–590.
- 125.- Nathalie Garcia-Russell, Samantha S. Orchard, Anca M. Segall. *Probing Nucleoid Structure in Bacteria Using Phage Lambda Integrase-Mediated Chromosome Rearrangements*. Methods in enzymology. 2008. Editado por John N. Abelson, Melvin I. Simon. California Institute of Technology. Pasadena, California.
- 126.- Das B, Martínez E, Midonet C, Barre FX. *Integrative mobile elements exploiting*. 2012. Xer recombination. Trends Microbiol. 2: 189-8.
- 127.- Lett MC. *Tn3-like elements: molecular structure, evolution*. 1988. Biochimie. 70(2):167-76.
- 128.- Michael Chandler and Jacques Mahillon. *Insertion sequences revisited*. Mobile DNA II. 2002. Editado por Nancy L. Craig, Robert Craigie, Martin Gellert, Alan M. Lambowitz. ASM Press. Whashington D.C..
- 129.- Harshey RM. *The Mu story: how a maverick phage moved the field forward*. 2012. Mob DNA. 5;3(1):21.
- 130.- Veeranagouda Y, Husain F, Wexler HM. *Transposon mutagenesis of the anaerobic commensal, Bacteroides fragilis, using the EZ::TN5 transposome*. 2012. FEMS Microbiol Lett. 333(2):94-100.
- 131.- Nielsen H, Johansen SD. *Group I introns: Moving in new directions*. 2009. RNA Biol. 6(4):375-83.
- 132.- Lambowitz AM, Zimmerly S. *Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA*. 2011. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1;3(8):3616.
- 133.- Sebaihia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R, Thomson NR, Roberts AP, Cerdeño-Tárraga AM, Wang H, Holden MT, Wright A, Churcher C, Quail MA, Baker S, Bason N, Brooks K, Chillingworth T, Cronin A, Davis P, Dowd L, Fraser A, Feltwell T, Hance Z, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Mungall K, Price C, Rabinowitsch E, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Unwin L, Whithead S, Dupuy B, Dougan G, Barrell B, Parkhill J. *The multidrug-resistant human pathogen Clostridium difficile has a highly mobile, mosaic genome*. 2006. Nat Genet. 38(7):779-86.
- 134.- Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. *Evidence for extensive resistance gene transfer among Bacteroides spp. and among Bacteroides and other genera in the human colon*. 2001. Appl Environ Microbiol. 67(2):561-8.

- 135.- Shoemaker NB, Salyers AA. *Tetracycline-dependent appearance of plasmidlike forms in Bacteroides uniformis 0061 mediated by conjugal Bacteroides tetracycline resistance elements*. 1988. J Bacteriol. 170(4):1651-7.
- 136.- Salyers AA, Shoemaker NB, Stevens AM, Li LY. *Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements*. 1995. Microbiol Rev. 59(4):579-90.
- 137.- Parker AC, Smith CJ. *Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A beta-lactamase responsible for cefoxitin resistance in Bacteroides species*. 1993. Antimicrob Agents Chemother. 37(5):1028-36.
- 138.- Madinier I, Fosse T, Giudicelli J, Labia R. *Cloning and biochemical characterization of a class A beta-lactamase from Prevotella intermedia*. 2001. Antimicrob Agents Chemother. 45(8):2386-9.
- 139.- Franke AE, Clewell DB. *Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in Streptococcus faecalis that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid*. 1981. J Bacteriol. 145(1):494-502.
- 140.- Roberts AP, Mullany P. *Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance*. 2011. FEMS Microbiol Rev. 35(5):856-71.
- 141.- Tribble GD, Parker AC, Smith CJ. *The Bacteroides mobilizable transposon Tn4555 integrates by a site-specific recombination mechanism similar to that of the gram-positive bacterial element Tn916*. 1997. J Bacteriol. 179(8):2731-9.
- 142.- Salyers AA, Shoemaker NB, Stevens AM, Li LY. *Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements*. 1995. Microbiol Rev. 59(4):579-90.
- 143.- Smith C.J. *Characterization of Bacteroides ovatus plasmid pBII36 and structure of its clindamycin resistance region*. 1985. J Bacteriol. 161(3): 1069–1073.
- 144.- Smith C. J., Rollins L.A., Parker A.C. *Nucleotide sequence determination and genetic analysis of the Bacteroides plasmid, pBII43*. 1995. Plasmid 34:211–222.
- 145.- Shoemaker NB, Wang GR, Salyers AA. *Multiple Gene Products and Sequences Required for Excision of the Mobilizable Integrated Bacteroides Element*. 2000. J Bacteriol. 182(4):928-36.
- 146.- Ragan MA. *Detection of lateral gene transfer among microbial genomes*. 2001. Curr Opin Genet Dev. 11(6):620-6.
- 147.- Ragan MA, Harlow TJ, Beiko RG. *Do different surrogate methods detect lateral genetic transfer events of different relative ages?* 2006. Trends Microbiol. 14(1):4-8.

- 148.- Skarin H, Segerman B. *Horizontal gene transfer of toxin genes in Clostridium botulinum: Involvement of mobile elements and plasmids*. 2011. Mob Genet Elements. 1(3):213-215.
- 149.- Skarin H, Håfström T, Westerberg J, Segerman B. *Clostridium botulinum group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements*. 2011. BMC Genomics. 12:185.
- 150.- Brouwer MS, Warburton PJ, Roberts AP, Mullany P, Allan E. *Genetic organisation, mobility and predicted functions of genes on integrated, mobile genetic elements in sequenced strains of Clostridium difficile*. 2011. PLoS One. 6(8):e23014.
- 151.- Marshall KM, Bradshaw M, Johnson EA. *Conjugative botulinum neurotoxin-encoding plasmids in Clostridium botulinum*. 2010. PLoS One. 5(6):e11087.
- 152.- Wang H, Roberts AP, Lyras D, Rood JI, Wilks M, Mullany P. *Characterization of the ends and target sites of the novel conjugative transposon Tn5397 from Clostridium difficile: excision and circularization is mediated by the large resolvase, TndX*. 2000. J Bacteriol. 182(13):3775-83.
- 153.- Lyras D, Adams V, Lucet I, Rood JI. *The large resolvase TnpX is the only transposon-encoded protein required for transposition of the Tn4451/3 family of integrative mobilizable elements*. 2004. Mol Microbiol. 51(6):1787-800.
- 154.- Wang H, Smith MC, Mullany P. *The conjugative transposon Tn5397 has a strong preference for integration into its Clostridium difficile target site*. 2006. J Bacteriol. 188(13):4871-8.
- 155.- Lucet IS, Tynan FE, Adams V, Rossjohn J, Lyras D, Rood JI. *Identification of the structural and functional domains of the large serine recombinase TnpX from Clostridium perfringens*. 2005. J Biol Chem. 280(4):2503-11.
- 156.- Lyras D, Rood JI. *Transposition of Tn4451 and Tn4453 involves a circular intermediate that forms a promoter for the large resolvase, TnpX*. 2000. Mol Microbiol. 38(3):588-601.
- 157.- Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brüssow H. *Prophage genomics*. 2003. Microbiol Mol Biol Rev. 67(2):238-76.
- 158.- Ochman H, Selander RK. *Evidence for clonal population structure in Escherichia coli*. 1984. Proc Natl Acad Sci U S A. 81(1):198-201.
- 159.- Bobay LM, Rocha EP, Touchon M. *The adaptation of temperate bacteriophages to their host genomes*. 2013. Mol Biol Evol. 30(4):737-51.
- 160.- Cheetham BF, Katz ME. *A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants*. 1995. Mol Microbiol. 18(2):201-8.

- 161.- Ready D, Pratten J, Roberts AP, Bedi R, Mullany P, Wilson M. *Potential role of Veillonella spp. as a reservoir of transferable tetracycline resistance in the oral cavity*. 2006. Antimicrob Agents Chemother. 50(8):2866-8.
- 162.-Hannan S, Ready D, Jasni AS, Rogers M, Pratten J, Roberts AP. *Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms*. 2010. FEMS Immunol Med Microbiol. 59(3):345-9.
- 163.- Ready D, Pratten J, Roberts AP, Bedi R, Mullany P, Wilson M. *Potential role of Veillonella spp. as a reservoir of transferable tetracycline resistance in the oral cavity*. 2006. Antimicrob Agents Chemother. 50(8):2866-8.
- 164.- Luppens SB, Kara D, Bandounas L, Jonker MJ, Wittink FR, Bruning O, Breit TM, Ten Cate JM, Crielaard W. *Effect of Veillonella parvula on the antimicrobial resistance and gene expression of Streptococcus mutans grown in a dual-species biofilm*. 2008. Oral Microbiol Immunol. 3(3):183-9.
- 165.- Pristas P, Piknova M, Sprincova A, Javorsky P. *Genetic variability of rumen Selenomonads*. 2008. Folia Microbiol (Praha). 53(2):165-72.
- 166.- Ivan J, Sprincová A, Javorský P, Pristas P. *Spreading and mutability of Selenomonas ruminantium plasmids*. 2006. Folia Microbiol (Praha). 51(4):283-5.
- 167.- Stanton TB, McDowall JS, Rasmussen MA. *Diverse tetracycline resistance genotypes of Megasphaera elsdenii strains selectively cultured from swine feces*. 2004. Appl Environ Microbiol. 70(6):3754-7.
- 168.- Stanton TB, Humphrey SB. *Isolation of tetracycline-resistant Megasphaera elsdenii strains with novel mosaic gene combinations of tet(O) and tet(W) from swine*. 2003. Appl Environ Microbiol. 69(7):3874-82.
- 169.- Piknová M, Bíres O, Javorský P, Pristas P. *Limited genetic variability in Megasphaera elsdenii strains*. 2006. Folia Microbiol (Praha).51(4):299-302.
- 170.- Rôças IN, Siqueira JF Jr. *Antibiotic resistance genes in anaerobic bacteria isolated from primary dental root canal infections*. 2012. Anaerobe. 18(6):576-80.
- 171.- Kalmokoff ML, Austin JW, Cyr TD, Hefford MA, Teather RM, Selinger LB. *Physical and genetic characterization of an outer-membrane protein (OmpM1) containing an N-terminal S-layer-like homology domain from the phylogenetically Gram-positive gut anaerobe Mitsuokella multacida*. 2009. Anaerobe. 15(3):74-81.
- 172.- Piknová M, Filova M, Javorský P, Pristas P. *A unique pair of GATC specific DNA methyltransferases in Mitsuokella multiacida*. 2005. Mol Biol Rep. 32(4):281-4.

Parte II

Materiales y métodos

1. Cepas empleadas en este trabajo.

La colección inicial de cepas de *Acidaminococcus* fue obtenida de muestras clínicas procedentes de la Unidad de Anaerobios del Hospital Ramón y Cajal entre los años 1993-1996. Una segunda colección fue amablemente cedida por la Dra. Helène Marchandin del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Arnaud de Villeneuve, en el Centro Universitario y Hospitalario de Montpellier (Francia) en 2007. Todas las cepas fueron manejadas en condiciones de anaerobiosis estricta conforme a los protocolos de la Unidad de Anaerobios del Hospital Ramón y Cajal, y un cribado inicial de la sensibilidad a los antibióticos más habituales (ampicilina, tetraciclina, estreptomycin, y cloranfenicol) fue sistemáticamente realizado mediante la técnica de sensibilidad disco-placa (Oxoid Limited, Cambridge, R.U.).

La colección RYC incluye todas las cepas de *A. fermentans* y *A. intestini* aisladas en el Hospital Ramón y Cajal. Todas son cepas clínicas y fueron aisladas en pacientes inmunodeprimidos (VIH, transplantados y oncológicos). En concreto, la cepa *A. intestini* RYC-MR95, que tomaremos como modelo en este estudio, procede de un absceso perianal en un paciente diabético. Sabemos, por estudios anteriores en nuestro laboratorio, que la cepa *A. fermentans* RYC-MR88 (Ap^r) codifica el mismo determinante de resistencia a los antibióticos β -lactámicos que *A. intestini* RYC-MR95 (Ap^r). Igualmente se conocía la existencia de resistencia a la tetraciclina entre las cepas de la colección RYC (5/8 cepas), sin embargo en el momento de iniciar este trabajo no había evidencia sobre el patrón de resistencias en la colección, el tipo de genes *tet*, ni sobre el vehículo genético que las portaba, así como tampoco si éste podría ser el mismo en todas o la mayoría de las cepas RYC.

La colección HAV incluye una serie de cepas clínicas aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Arnaud de Villeneuve, en Montpellier (Francia), obtenidas desde 1996 hasta 2004 (1) en una serie de pacientes, entre los 18 y 88 años de edad. Las cepas fueron recuperadas de diferentes abscesos (recto, peritoneal, abdominal, mandibular, axilar o inguinal). Los mecanismos de resistencia de las cepas pertenecientes a la colección HAV eran completamente desconocidas y la caracterización de parte de estos determinantes fue realizada durante esta Tesis.

Especie	Cepa
	Colección RYC
<i>A. intestini</i>	RYC-MR95
<i>A. intestini</i>	RYC-MR02
<i>A. intestini</i>	RYC-MR37
<i>A. intestini</i>	RYC-MR56
<i>A. intestini</i>	RYC-MR24
<i>A. intestini</i>	RYC-MR93
<i>A. fermentans</i>	RYC-MR88
	Colección HAV
<i>A. intestini</i>	ADV5206.02
<i>A. intestini</i>	B2093
<i>A. intestini</i>	B3397
<i>A. intestini</i>	LBN316
<i>A. intestini</i>	B1347
<i>A. intestini</i>	B3093
<i>A. intestini</i>	B2316
<i>A. intestini</i>	B4276
<i>A. intestini</i>	LBN321
<i>A. intestini</i>	B5768
<i>A. intestini</i>	LBN317
<i>A. intestini</i>	B3202
<i>A. intestini</i>	B4271
<i>A. intestini</i>	ADV5199.04
<i>A. intestini</i>	ADV1190.04
<i>A. intestini</i>	B5309
<i>A. intestini</i>	B1397
<i>A. intestini</i>	B2290
<i>A. intestini</i>	LBN318
<i>A. intestini</i>	LBN320
<i>A. intestini</i>	B5175
<i>A. intestini</i>	LBN319
<i>A. intestini</i>	B255
<i>A. fermentans</i>	ADV2297.03
<i>A. fermentans</i>	ADV1338.05
<i>A. fermentans</i>	ADV6092.03
<i>A. fermentans</i>	CIP106432

Tabla 1.- Colecciones de cepas empleadas en este trabajo.

Otras cepas empleadas en este trabajo, para los experimentos de conjugación: se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (C.E.C.T., en la Universidad de Valencia) las cepas tipo *Streptococcus salivarius* CECT 805 y *Streptococcus oralis* CECT 907.

La cepa *A. intestini* RYC-MR95 fue elegida como cepa-modelo en nuestro trabajo para hacer los estudios de caracterización de los diferentes determinantes de resistencia y de los entornos genéticos donde estaban codificados. Una vez definidos estos entornos, estudios de genómica comparada permitieron inferir las relaciones evolutivas entre las diferentes cepas pertenecientes a ambas colecciones. Esta cepa fue elegida debido a que sirvió de modelo en trabajos previos en nuestro laboratorio al ser la primera cepa de un anaerobio Gram negativo en la cual se encontró una enzima β -lactamasa (2).

2. Métodos de cultivo.

2.1 Medios de cultivo.

El medio más comúnmente empleado en el laboratorio de Microbiología para el cultivo y aislamiento de bacterias anaerobias es Agar Brucella (DIFCO, Madrid, España), por lo que se consideró este medio como el óptimo para realizar los diferentes tipos de ensayos (crecimiento, conjugación, sensibilidad antibiótica, etc.) en las especies de *Acidaminococcus*.

Para el enriquecimiento en medio líquido se empleó caldo Tioglicolato (OXOID Limited, Hampshire, R.U.), previamente reducido. Al crear un entorno con bajo potencial redox, los agentes reductores evitan la acumulación de peróxidos que pueden ser tóxicos para algunos microorganismos.

Para los experimentos de conjugación con cepas de *Streptococcus* se empleó Agar sangre (DIFCO). El caldo BHI (Brain Heart Infusion, de OXOID Limited) se empleó preferentemente para el enriquecimiento de *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus oralis* y en experimentos de conjugación.

2.2 Condiciones de cultivo.

El cultivo de especies anaerobias estrictas requiere el mantenimiento de una atmósfera cuya presión parcial de oxígeno sea cercana a cero (en concreto, suele haber una proporción de oxígeno del 1%). Durante este trabajo, se han empleado dos metodologías para conseguir el adecuado cultivo de los *Acidaminococcus*:

Se utilizó una cámara anaerobia Thermo Forma Anaerobic System Modelo 1025/1029 (Thermo Fisher Scientific S.L.U.), que permite el establecimiento de una atmósfera anaeróbica adecuada de manera permanente, mediante el suministro externo de CO₂ desde bombonas de gas licuado. En esta cámara es posible la manipulación desde el exterior de las muestras (acceso mediante guantes instalados en la misma), en todo momento en completa anaerobiosis. Posee en su interior una estufa a 37°C. En otras ocasiones se emplearon jarras de anaerobiosis portátiles. Se trata de campanas de metacrilato de 2,5 litros en las que se genera una atmósfera anaeróbica con el sistema AnaeroGen™ (OXOID Limited), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Siempre que se realizaba un cultivo en anaerobiosis, independientemente del procedimiento empleado, se realizaba un control de ausencia de crecimiento en aerobiosis.

Para los experimentos de conjugación se cultivaban de manera independiente la cepa donadora de *Acidaminococcus*, portadora del marcador de resistencia que queríamos transferir, y la cepa receptora de *Streptococcus*, sensible a tal marcador, siguiendo el protocolo previamente descrito por Ready et al. (3). Después de crecer en condiciones de anaerobiosis y microaerofilia durante 72 o 24h respectivamente, las cepas eran resuspendidas en suero salino y por filtración eran fijadas a una membrana de nitrocelulosa (Milipore™, IR). Este filtro era posteriormente depositado en una placa de Agar Brucella, la cual era incubada en condiciones de anaerobiosis estricta. A las 48-72h se resuspendía todo el césped bacteriano y se inoculaba en placas de Agar Sangre con una concentración selectiva del antibiótico para cuyo marcador de resistencia queríamos demostrar movilidad. Estas placas eran incubadas a 37°C en condiciones aeróbicas.

3. Métodos de detección de la resistencia a los antibióticos.

3.1 Métodos fenotípicos.

Como cribado para definir cualitativamente perfiles de sensibilidad se empleó el método clásico de sensibilidad de disco-placa. En *Acidaminococcus*, al no existir criterios aceptados de sensibilidad o resistencia para la mayoría de los antibióticos, se definió como sensible o resistente la presencia o ausencia de halos de inhibición.

Una vez que el perfil de resistencia a los antibióticos tetraciclina, ampicilina, eritromicina y cloranfenicol de las diferentes cepas de *Acidaminococcus* de las 2 colecciones empleadas en este estudio fueron definidos, mediante el método de E-test (Biomérieux, France) se estimó el valor de CMI siguiendo las recomendaciones del fabricante en el caso de los antibióticos tetraciclina y ampicilina.

3.2 Métodos genotípicos.

A partir de los perfiles de resistencia inferidos de los métodos fenotípicos, se intentaron amplificar mediante PCR los determinantes de resistencia a β -lactámicos, tetraciclinas y macrólidos. Para ello se emplearon cebadores específicos para la β -lactamasa ACI-I, previamente descrita en *Acidaminococcus*, cebadores específicos para *tet(M)*, *tet(W)*, *tet(32)*, *tet(O)*, y cebadores específicos para la resistencia a macrólidos, *erm(A)*, *erm(B)* y *mef* (no mostrados). Los cebadores empleados en cada caso se describen en la tabla 2.

Se utilizó la polimerasa termoresistente comercial AmpliTaq Gold[®] (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California) (véase más adelante). La secuenciación de los genes amplificados se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del Centro de Investigaciones Biomédicas (CSIC-UAM).

Gen	Nombre cebador	Secuencia	TM	Tª anillamiento PCR	Tamaño amplicón
<i>tet(W)</i>	TetW-F	5'-GAGAGCCTGCTATATGCCAGC-3'	66°C		
	TetW-R	5'-GGGCGTATCCACAATGTTAAC-3'	62°C	61°C	168 pb.
<i>tet(32)</i>	Tet(32)For	5'-GAACCAGATGCTGCTCTT-3'	54°C		
	Tet(32)Rev	5'-CATAGCCACGCCCACATGAT-3'	62°C	53°C	621 pb.
<i>tet(M)</i>	TetM-FW	5'-ACAGAAAGCTTATTATATAAC-3'	52°C		
	TetM-RV	5'-TGGCGTGTCTATGATGTTTAC-3'	62°C	51°C	171 pb.
<i>tet(O)</i>	TetO-FW	5'-ACGGATAGTTTATTGTATACC-3'	56°C		
	TetO-RV	5'-TGGCGTATCTATAATGTTGAC-3'	58°C	54°C	171 pb.
<i>aci1</i>	REV-S1	5'-CTACTGCTCGACACACAA-3'	54°C		
	PACI-V2	5'-ATTTGCCGCGGTGTTGT-3'	52°C	50°C	203 pb.

Tabla 2.- Cebadores empleados para la amplificación de genes de resistencia a tetraciclina y β -lactámicos (2, 4, 5).

Las condiciones de dichas PCR's fueron las siguientes: Para *tet(W)*: 94°C (1 minuto), 35 ciclos de [94°C (1 minuto), 64°C (1 minuto), 72°C (2 minutos)] y un ciclo de 72°C (20 minutos). Para *tet(32)*: 94°C (1 minuto), 35 ciclos de [94°C (1 minuto), 57°C (1 minuto), 72°C (2 minutos)] y un ciclo de 72°C (20 minutos).

4. Técnicas de extracción y amplificación del ADN.

4.1 Extracción y purificación del ADN.

Para llevar a cabo la PCR inversa (6, 7, 8, 9) necesitamos un ADN genómico con la máxima pureza. Utilizamos para ello el kit comercial GNOME DNA isolation Kit™, (Q-Biogene; MP Biomedicals LLC). Se siguió el protocolo suministrado por el fabricante. El ADN se recupera recogiendo con asa estéril de la solución de TE/etanol. Para la obtención de ADN plasmídico se utilizó el Plasmid Mini Kit™ (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante.

4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): PCR convencional y PCR inversa.

La base de la caracterización genética de las regiones flanqueantes de los determinantes de resistencia descritos en *A. intestini* RYC-MR95 fue la técnica de la PCR inversa. Esta aproximación

fue elegida al carecer de información de secuencia nucleotídica de ninguna de las especies del género ni de géneros relacionadas que pudieran ser utilizadas como modelo para el diseño de cebadores. Cada resultado o información de secuencia obtenida era reconfirmado por PCR convencional, para garantizar que el ensamblaje realizado era correcto.

De modo general, para las técnicas de PCR empleamos dos tipos de polimerasas termoresistentes: LA Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) capaz de amplificar fragmentos >6 Kb y Ampli Taq Gold (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California), enzima cuya procesividad por ciclo de replicación es aproximadamente ≤ 3 Kb. La Taq se empleó en los ensayos de PCR inversa mientras que AmpliTaq Gold fue empleada en PCR convencional.

La PCR inversa (6, 7, 8, 9) es una variación de la PCR convencional que consiste en la utilización de cebadores específicos que se disponen orientados en sentido contrario uno con respecto al otro. El fundamento de esta técnica consiste en la digestión del ADN genómico con diferentes endonucleasas de restricción. Para facilitar el protocolo de trabajo se eligieron sistemáticamente las siguientes enzimas: EcoRI, PstI, SspI, EcoRV, BamHI, HindIII, PvuII, HindII (F. Hoffmann-La Roche Ltd.), excluyendo en cada caso aquellas enzimas que pudieran digerir el ADN en la región entre los dos cebadores específicos orientados en direcciones opuestas.

Los fragmentos genómicos obtenidos eran finalmente recircularizados mediante la ADN ligasa T4 (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basilea, Suiza). Después de los sucesivos procesos de purificación y precipitación del ADN recircularizado se realizaba un ensayo de PCR usando los cebadores en dirección contraria que permitirían amplificar la región de ADN desconocida desde el cebador hasta el punto de restricción elegido. De esta manera se ganaba nueva secuencia de las regiones flanqueantes. Finalmente para garantizar el correcto ensamblaje se diseñaba una PCR convencional usando cebadores homólogos del extremo conocido y cebadores en la nueva región cuya secuencia acababa de ser descifrada.

A medida que se iba determinando la secuencia adyacente a la región ya conocida, se realizaba también una PCR utilizando como molde el genoma de las cepas sensibles, no poseedoras, en principio, de la resistencia ni de su elemento móvil, de modo que se localizase el final del elemento al coincidir ambas secuencias. Todos los amplicones fueron secuenciados en empresas externas (Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid, el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols y Servicio de Secuenciación de la empresa MacroGen Inc. en Corea del Sur). Las secuencias nucleotídicas recibidas una vez comprobadas por

PCR su posición adyacente al fragmento conocido eran comparadas en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (blast.ncbi.nlm.nih.gov) y European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk).

5. Análisis bioinformático.

- Las bases de datos utilizadas en este trabajo son: *refseq_genomic* (Genomic sequences from NCBI Reference Sequence Project), *nr* (all GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences), *refseq* (Protein sequences from NCBI Reference Sequence project) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov), así como la base de datos de proteínas Uniprot (www.ebi.ac.uk/uniprot) (10).

- Artemis y ACT (11, 12): La anotación manual de los elementos móviles se llevó a cabo con el programa Artemis, y las representaciones gráficas de homologías e identidades con el programa ACT (ambos desarrollados en el Sanger Institute, R.U.).

- Open Reading Frame Finder (NCBI) (13): Este programa permite identificar marcos de lectura abierta en una secuencia dada, con objeto de identificar posibles genes o unidades de transcripción en cualquiera de los seis posibles marcos de lectura. Desde su interfaz puede lanzarse un BLAST sobre las bases de datos del NCBI para identificar *orf* similares, de modo que podamos asignarle una identidad teórica. (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf).

- El análisis de secuencias por comparación con las depositadas en las bases de datos se llevó a cabo utilizando BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) (14) y Clustal (15, 16), un programa que permite el alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas o aminoácidas.

- Jmodeltest (17, 18): programa empleado para calcular el algoritmo estadístico más adecuado a cada grupo de datos para elaborar un árbol filogenético con significación estadística real.

- Se utilizó el paquete informático Jemboss, principalmente los programas de la herramienta Phylip (19), para construir los árboles filogenéticos.

- Se utilizaron los programas SeaView (20) y UGENE (ugene.unipro.ru) (21) para la manipulación y cambios de formato de las secuencias con que se trabajó.

6. Técnicas de hibridación.

Se diseñaron sondas de ADN utilizando como molde la secuencia de los genes de resistencia a tetraciclina *tet*(W) y *tet*(32), la secuencia del gen de la β -lactamasa *bla_{aci1}*, así como la secuencia conocida de dos recombinasas (*dra01* y *dra02*) que se sabía estaban localizadas junto al gen de la β -lactamasa. Todas estas sondas se hibridaron con el genoma completo de las cepas RYC tratado con endonucleasas de restricción.

Se utilizó el método comercial de *Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System* (GE Healthcare UK Limited, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA, R.U.), siguiéndose el protocolo suministrado por el fabricante.

7. Conjugación de *Acidaminococcus* con *Streptococcus*: Selección por muerte en aerobiosis.

El protocolo para este experimento se basa en el método detallado en el trabajo de Ready y col. (3) (véase el apartado 2.2 para más detalles). Se trata de un experimento diseñado para probar la transferencia del marcador de resistencia a tetraciclina entre *Acidaminococcus* y *Streptococcus*.

La conjugación se lleva a cabo en anaerobiosis. Después, en aerobiosis y en presencia del antibiótico, se seleccionan los transconjugantes resistentes a tetraciclina. La aerobiosis elimina todos los *Acidaminococcus*, incapaces de sobrevivir en condiciones aeróbicas, de modo que se seleccionarían los *Streptococcus* que hubieran recibido el marcador de resistencia.

A partir de cultivos en agar sangre a confluencia de *A. intestini* RYC-MR95, *S. oralis* CECT 907 y *S. salivarius* CECT 805, resuspendemos el raspado de cada cultivo en 1 ml de suero salino. En dos nuevos tubos, se añaden 0,5 ml de *S. oralis* CECT 907 y de *S. salivarius* CECT 805

respectivamente. Sobre ambos tubos, se añaden 1 ml de la suspensión de *A. intestini* RYC-MR95. Esta mezcla se mantiene 30 minutos, y después se pasa a través de un filtro de nitrocelulosa estéril, el cual se coloca sobre una placa de agar sangre y de nuevo se lleva a anaerobiosis, 48h a 37°C. Como control de la conjugación, dado que *Streptococcus* es competente natural, se añade DNAsa en otra alícuota.

Una vez crecido, este cultivo se pasa a una nueva placa de agar sangre y se deja crecer a 37°C en condiciones aeróbicas, en una placa con tetraciclina a 5 µg/ml. Como control adicional, se cultivan ambas especies de *Streptococcus* en presencia de antibiótico, para comprobar su sensibilidad a la tetraciclina. De las colonias crecidas en estas condiciones se extraerá su ADN y se comprobará mediante PCR y posterior secuenciación la presencia de los marcadores de resistencia cuya movilidad quería ser demostrada.

8. Otras técnicas empleadas: Intentos de movilización por mutación causada por irradiación con luz UV.

Para la realización de este experimento, se procedió a realizar una curva de muerte como control, en la cual se observa que, con las cepas RYC-MR95 y RYC-MR02, el tiempo de irradiación con luz UV ($\lambda=366$ nm) adecuado para obtener un número discreto suficiente de UFC (no cuantificado) es de 1 minuto.

Tras sembrar 11 placas de Petri con agar Brucella (10 + 1 de control) por cada una de las dos cepas a ensayar (RYC-MR95 y RYC-MR02), procedentes de cultivo fresco, se irradian 10 placas por cepa durante 1 minuto con luz UV a la citada longitud de onda. Seguidamente, se incuban durante dos días a 37°C en atmósfera anaeróbica, tras lo cual se obtienen colonias discretas, supervivientes a la irradiación. Las placas control muestran el crecimiento normal, a confluencia, de las cepas sin irradiar.

A continuación, por cada placa de cultivo obtenida tras la irradiación, y mediante la técnica de *replica plating*, se inoculan dos nuevas placas de agar Brucella, una con ampicilina (10mM) y la otra sin este antibiótico. Las placas con ampicilina servirán para seleccionar aquellas colonias que han mutado o perdido la actividad β -lactamasa de algún modo. Las carentes de ampicilina sirven como control negativo. Las placas originales se conservan. Se incuban las placas replicadas durante

2 días a 37°C, en atmósfera anaeróbica. Comparando la placa con ampicilina y la original, podremos deducir qué colonias han mutado o perdido la actividad β -lactamasa. Cada colonia candidata se siembra en una placa independiente, se extrae el ADN genómico total y se comprueba por PCR si ha mutado la β -lactamasa o bien la ha perdido. En caso de pérdida, se examina por PCR seguida de secuenciación si ha habido movilización del elemento.

9. Referencias.

- 1.- Jumas-Bilak E, Carlier JP, Jean-Pierre H, Mory F, Teyssier C, Gay B, Campos J, Marchandin H., *Acidaminococcus intestini* sp. nov., isolated from human clinical samples. 2007. Int J Syst Evol Microbiol. 57(10):2314-9.
- 2.- Galán JC, Reig M, Navas A, Baquero F, Blázquez J. *ACI-I* from *Acidaminococcus fermentans*: characterization of the first beta-lactamase in Anaerobic cocci. 2000. Antimicrob Agents Chemother. 44(11):3144-9.
- 3.- Ready D, Pratten J, Roberts AP, Bedi R, Mullany P, Wilson M. *Potential role of Veillonella spp. as a reservoir of transferable tetracycline resistance in the oral cavity*. 2006. Antimicrob Agents Chemother. 50(8):2866-8.
- 4.- Aminov R., Garrigues-Jeanjean N., Mackie R. *Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins*. 2001. Appl. And Env. Micr. 67(1) 22-32.
- 5.- Melville C., Scott K., Mercer D., Flint H. *Novel tetracycline resistance gene, tet(32), in the Clostridium-related human colonic anaerobe K10 and its transmission in vitro to the rumen anaerobe Butyrivibrio fibrisolvens*. 2001. Ant. Ag. and Chem. 45(11) 3246-3249.
- 6.- Collins FS, Weissman SM. *Directional cloning of DNA fragments at a large distance from an initial probe: a circularization method*. 1984. Proc Natl Acad Sci U S A. 81(21):6812-6.
- 7.- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. *Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction*. 1988. Genetics. 120(3):621-3.
- 8.- Higuchi RG, Ochman H. *Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction*. 1989. Nucleic Acids Res. 25;17(14):5865.
- 9.- Ochman H, Ajioka JW, Garza D, Hartl DL. *Inverse polymerase chain reaction*. 1990. Biotechnology (N Y). 8(8):759-60.
- 10.- UniProt Consortium. *Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt)*. 2012. Nucleic Acids Res. 40: 71-75.
- 11.- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. *Artemis: sequence visualization and annotation*. 2000. Bioinformatics. 16(10):944-5.
- 12.- Carver T, Berriman M, Tivey A, Patel C, Böhme U, Barrell BG, Parkhill J, Rajandream MA. *Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database*. 2008. Bioinformatics. 1;24(23):2672-6.
- 13.- Rombel IT, Sykes KF, Rayner S, Johnston SA. *ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification*.

2002. *Gene*. 9;282(1-2):33-41.

14.- Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. 1997. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

15.- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. *Clustal W and Clustal X version 2.0*. 2007. *Bioinformatics*. 23, 2947-2948.

16.- Higgins DG, Sharp PM. *CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer*. 1988. *Gene*. 15;73(1):237-44.

17.- Posada D. *jModelTest: Phylogenetic Model Averaging*. 2008. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

18.- Guindon S, Gascuel O. *A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood*. 2003. *Syst Biol*. 52: 696-704.

19.- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. *New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0*. 2010. *Systematic Biology*. 59(3):307-21.

20.- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. *SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building*. 2010. *Mol Biol Evol*. 27(2):221-4.

21.- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, UGENE team. Colaboradores: Varlamov A, Vaskin Y, Efremov I, Grehov G, Kandrov D, Rasputin K, Syabro M, Tleukenov T. *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit*. 2012. *Bioinformatics*. 28(8):1166-7.

Objeto de la presente Tesis

Este trabajo pretende estudiar la identidad y estructura de los vehículos genéticos de transferencia horizontal de dos genes de resistencia a antibióticos en el género *Acidaminococcus*: el gen de resistencia a tetraciclina *tet*(32) y el gen *bla*_{aci1}, que codifica la β -lactamasa ACI-1.

De manera secundaria, pretende llevar a cabo estudios preliminares que muestren evidencias sobre su capacidad de movilización.

Parte III

Resultados

1. Resistencias a los antibióticos encontradas en las cepas en estudio.

1.1 Estudio previo del perfil de resistencias.

La Tabla 1 resume el perfil de resistencia antibiótica de las cepas de *A. intestini* y *A. fermentans* obtenidas en el estudio previo de sensibilidad.

Seguidamente, se efectuó un estudio de hibridación mediante transferencia de *Southern*, empleando sondas diseñadas en base a la literatura existente, contra los genes *tet* principales (datos no mostrados), para posteriormente centrarse en *tet*(W) y *tet*(32). Del mismo modo, se realizaron sondas utilizando la secuencia ya conocida de los genes *bla_{aci1}*, *dra01* y *dra02* (todos ellos secuenciados previamente en nuestro grupo, correspondientes a la β -lactamasa ACI-1 y a sus dos recombinasas en tándem adyacentes). Con estas sondas se analizó el genoma completo (extraído, purificado y posteriormente tratado con diferentes endonucleasas de restricción) de las cepas de la colección RYC.

Finalmente, se procedió a la secuenciación de los genes *tet* detectados. Mediante PCR específica, se detectó el determinante de resistencia a tetraciclina *tet*(W) en las cepas RYC-MR95, RYC-MR37, RYC4093 y RYC-MR88, siendo negativa en el resto de cepas. En el caso del gen *tet*(32), se identificó mediante PCR en las cepas RYC-MR95, RYC4356 y RYC4093. Se determinó por secuenciación que el gen *tet*(32) identificado en RYC-MR93 es un gen mosaico *tet*(W/32/W), a diferencia del resto de *tet*(32) secuenciados, que son genes no mosaico. Nótese además que en las cepas RYC-MR95 y RYC4093, están presentes tanto *tet*(32) como *tet*(W). Por el contrario, RYC-MR88 y RYC-MR37 solamente poseen el gen *tet*(W) y RYC4356 presenta únicamente el gen *tet*(32).

En cuanto a la colección de cepas francesas, encontramos en el cribado inicial 13 cepas resistentes, a saber: LBN321, ADV5206.02, B2093, B3397, B1347, B3202, ADV1190.04, B2290, B2316, LBN318, LBN319, B5309, todas ellas de la especie *A. intestini*. El resto de cepas de la colección resultaron ser sensibles a la tetraciclina.

Especie	Cepa	Ap	Tc	Em	Cn
<i>A. intestini</i>	RYC-MR95	R	R		
<i>A. intestini</i>	RYC-MR02	R	S		
<i>A. intestini</i>	RYC-MR24	R	S		
<i>A. intestini</i>	RYC-MR37	R	R		
<i>A. intestini</i>	RYC-MR56	S	R		
<i>A. fermentans</i>	RYC-MR88	R	S		
<i>A. intestini</i>	RYC-MR93	S	R		
<i>A. intestini</i>	ADV5206.02	R	R	R	R
<i>A. intestini</i>	B2093	R	R	R	R
<i>A. intestini</i>	B3397	R	R	R	R
<i>A. intestini</i>	LBN316	R	S		
<i>A. intestini</i>	B1347	R	R	R	R
<i>A. intestini</i>	B3093	R	S		
<i>A. intestini</i>	B2316	R	S	R	R
<i>A. intestini</i>	B4276	R	S	S	S
<i>A. intestini</i>	LBN321	S	R	S	S
<i>A. intestini</i>	B5768	S	S	S	S
<i>A. intestini</i>	LBN317	S	S	S	S
<i>A. intestini</i>	B3202	S	R	R	S
<i>A. intestini</i>	B4271	S	S	S	S
<i>A. intestini</i>	ADV5199.04	S	S	S	S
<i>A. intestini</i>	ADV1190.04	S	S	S	S
<i>A. intestini</i>	B5309	S	R	S	R
<i>A. intestini</i>	B1397	S	S	S	S
<i>A. intestini</i>	B2290	S	R	R	R
<i>A. intestini</i>	LBN318	S	R	R	S
<i>A. intestini</i>	LBN320	S	S	S	S
<i>A. intestini</i>	B5175	S	S	S	S
<i>A. intestini</i>	LBN319	S	R	R	R
<i>A. intestini</i>	B255	S	S	S	S
<i>A. fermentans</i>	ADV2297.03	S	S	S	S
<i>A. fermentans</i>	ADV1338.05	S	S	S	S
<i>A. fermentans</i>	ADV6092.03	S	S	S	S
<i>A. fermentans</i>	CIP106432	S	S	-	-

Tabla 1. Patrón de resistencia a ampicilina (Ap), tetraciclina (Tc), eritromicina (Em) y cloranfenicol (Cn) presentado por las cepas utilizadas en este trabajo.

	RYC-MR95	RYC-MR02	RYC-MR24	RYC-MR37	RYC-MR56	RYC-MR88	RYC-MR93
<i>tet(W)</i>	-	-	-	+	-	-	+
<i>tet(32)</i>	+	-	-	-	+	-	+
<i>bla_{aci1}</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>dra01</i>	++	+	+	+	+	+	+
<i>dra02</i>	++	+	+	+	+	++	+

Tabla 2. Resultados del estudio de hibridación por transferencia de Southern de las sondas para los genes *tet(W)*, *tet(32)*, *bla_{aci1}*, *dra01* y *dra02* frente al ADN genómico de las cepas de la colección RYC. (+ +) simboliza la presencia de dos copias del gen detectado.

2. Entorno genético de la β -lactamasa ACI-1.

2.1.- Entorno genético inmediato a *bla_{aci1}*

La descripción de un gen que confiere resistencia a los antibióticos β -lactámicos en bacterias anaerobias es un hecho poco frecuente, pero si éste es capaz de conferir resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido, tales como cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ), debe ser objeto de estudio, ya que este tipo de enzimas han llegado a ser las más prevalentes en enterobacterias a nivel mundial, responsables de múltiples brotes epidémicos, constituyendo un problema de salud pública global (1, 2).

La β -lactamasa ACI-1 (*bla_{ACI-1}*) se clasifica en el grupo 2be del esquema de clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros (3). Es capaz de hidrolizar eficientemente CTX y CAZ (4) en una bacteria anaerobia del tracto gastrointestinal humano, su importancia radica en que puede llegar a ser un problema de salud pública si fuera fácilmente transmisible (5). Por este motivo, el primer propósito de este trabajo fue conocer el entorno genético que contiene el gen *bla_{aci1}* en las cepas clínicas donde fue inicialmente descrito. La cepa clínica RYC-MR95 fue la cepa de laboratorio en la que inicialmente se caracterizó este gen. También es en esta cepa donde se ha encontrado un doble juego de recombinasas en tándem, lo cual en principio la señala como de mayor interés. Ésta será la cepa de referencia empleada para describir el entorno genético de *bla_{aci1}*.

La secuenciación del entorno inmediato del gen *bla_{aci1}* permitió identificar genes adyacentes implicados en la transferencia horizontal de genes, tales como una secuencia de inserción nueva perteneciente a la familia de IS3 dispuesta corriente arriba y una secuencia homóloga a serin-recombinasas corriente abajo. Estos primeros datos justificaban aún más la necesidad de conocer completamente el entorno genético de *bla_{aci1}*.

Sobre la información previa obtenida mediante PCR inversa se fueron conociendo progresivamente las regiones flanqueantes tanto corriente arriba como corriente abajo del gen *bla_{aci1}*, hasta completar un fragmento inicial de 9,8 Kb.. Después de varios meses de trabajo aplicando esta metodología, el esquema de la región conocida se detalla en la figura 1.

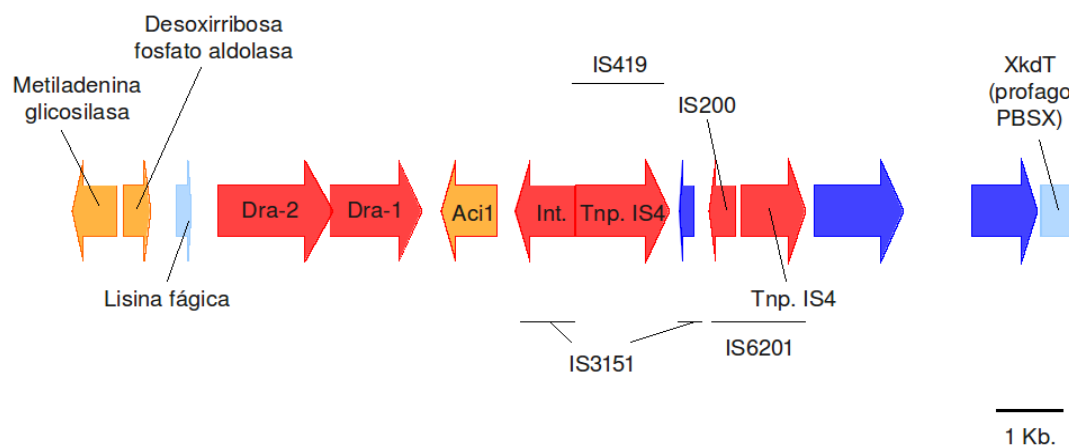


Figura 1.- Representación esquemática de las 9.8 Kb. más próximas flanqueantes al gen *bla_{aci1}* descrito en la cepa de *A. intestini* RYC-MR95. Los *orfs* (*open readin frames* o secuencias de lectura abierta) en color rojo corresponden con genes implicados en procesos de movilidad (IS, o resolvasas), los *orfs* en color azul-claro corresponden a genes de origen fágico, los *orfs* en color naranja muestran similitud con genes de regulación y los *orfs* azul-oscuro con proteínas hipotéticas.

Denotaremos los *orf* de la siguiente manera: la letra U (*upstream*) indicará el número de *orf* aguas arriba de la β -lactamasa contando a partir de ella. Con la letra D (*downstream*) los situados aguas abajo, de nuevo contando desde la β -lactamasa.

Los *orf* D1 (gen *dra1*) y D2 (gen *dra2*) corresponden al sistema formado por dos serina-recombinasas dispuestas en tándem. Estas resolvasas constituyen un sistema doble similar al descrito en el elemento móvil implicado en resistencia a meticilina SSCmec en *Staphylococcus aureus* (6, 7).

Ambos sistemas presentan gran identidad, tanto en su disposición a nivel estructural como en semejanza a nivel aminoacídico. En SSCmec, ambas proteínas (genes *ccrA* y *ccrB*) son suficientes para la movilidad (escisión e integración) del elemento (8), siendo necesario que ambas resolvasas sean activas para que el elemento sea capaz de movilizarse desde el cromosoma.

El *orfU1* fue identificado inicialmente en nuestro Servicio (4) como el *orfB* de las IS150 (9) en *E. coli* (30% identidad aminoacídica), de la IS150 del plásmido Pox1 (10) de *Bacillus anthracis* (31% identidad aminoacídica) o de la IS defectiva de SSCmec (6) de *S. aureus* (26% identidad aminoacídica).

En la revisión realizada de los datos para la presente tesis, utilizando las bases de datos actualizadas, confirmamos la identidad como la transposasa *orfB* de una secuencia de inserción de la familia de IS3, presentando la mayor identidad a nivel nucleotídico con las presentes en *Bacteroides pectinophilus* ATCC 43243, *Geobacillus sp.* Y412MC10 y *Brevibacillus brevis* NBRC 100599. Esta secuencia se denominó IS3151, siendo la primera secuencia de inserción descrita en cocos anaerobios (4).

Del mismo modo, se confirma la identidad del *orf8* con una transposasa de la familia IS4, la IS419, presente en *Mitsuokella multacida* DSM 20544, *Roseburia inulinivorans* DSM 16841 y *Clostridium nexile* DSM 1787. El *orf9* fue inicialmente identificado como el *orfA* de IS3151. Tras la revisión de las bases de datos, la mayor identidad a nivel nucleotídico se da con la IS3151 presente en *Bacteroides pectinophilus* ATCC 43243. Así pues, la IS419 estaría interrumpiendo IS3151. No está confirmada la identidad de este *orf*, por lo que en el esquema se señala en azul, como proteína hipotética.

Por otro lado, el *orf10* se identifica con una transposasa de la familia de IS200. La mayor identidad a nivel nucleotídico aparece, con la transposasa presente en *Clostridium scindens* ATCC 35704, confirmándose lo inicialmente descrito. El *orf11*, descrito como perteneciente a la familia IS4, se confirma como una transposasa de esta familia de secuencias de inserción.

Ambos *orf*, 10 y 11, podrían constituir la nueva IS6201 (4). Los extremos de este fragmento central analizado corresponden a una metiladenina glicosilasa (en 5') y un *orf* (XkdT) perteneciente al profago defectivo de *Bacillus subtilis* PBSX.

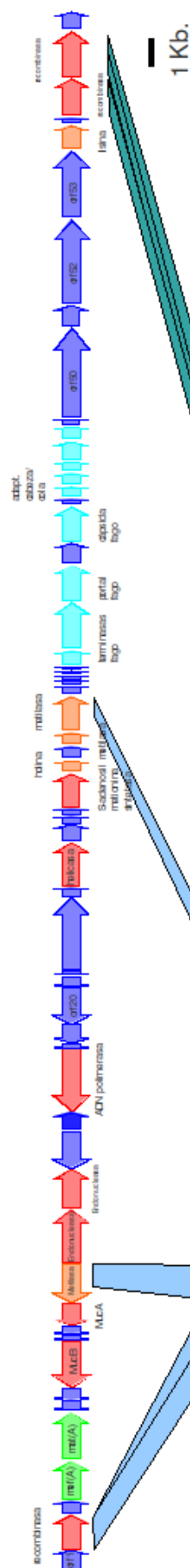
Lo más interesante en esta región inicial es la presencia de dos serin-recombinasas sitio específicas dispuestas en tándem que podrían proceder de un evento de duplicación génica ya que el inicio de la transcripción de Dra-1 ocurre antes de la finalización de la transcripción de Dra-2.

Estas serin-recombinasas presentan alta homología con elementos genéticos móviles como los descritos en *S. aureus* resistentes a meticilina, SCCmec (6) o el elemento MEGA (11) descrito en *S. pneumoniae* o el Tn1207.3 (12) de *S. pyogenes* implicados en la diseminación de los determinantes de resistencia a macrólidos, tipo *mef*, en bacterias gram-positivas.

Los elementos citados (13, 14, 15, 16) han tenido un gran impacto clínico en la diseminación de los determinantes de resistencia que codifican.

***Streptococcus pyogenes* 2812A Tn1207.3**

GenBank: AY657002.1



***A. intestini*
RYC-MR95**

1 Kb.



***Staphylococcus aureus* NCTC10442, SSCmec type-I staphylococcal**

GenBank: AB033763.2

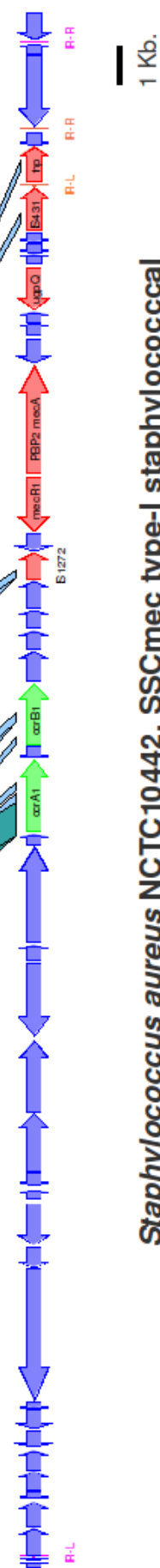


Figura 2.- Genómica comparada entre SCCmec, ACCaci y Tn1207.3.

2.2 Caracterización del elemento genético portador del gen *bla_{aci1}* en *A.intestini* RYC-MR95.

La identificación de dos serin-recombinasas sitio-específicas implicadas en la movilización y diseminación de determinantes de resistencia antibiótica en *S. pyogenes* y *S. aureus*, nos llevó a querer estimar cuál era la frecuencia de estas proteínas en aislados del genero *Acidaminococcus* con el fin de inferir si esta especie podría ser considerada como un reservorio de potencial resistencia a cefalosporinas de 3^a y 4^a generación en aislados clínicos de pacientes sometidos a tratamientos antibióticos intensivos y/o estancias prolongadas en hospitales. Se diseñaron ensayos de *Southern-Blot* usando como sonda fragmentos internos de las recombinasas sitio-específicas descritas en *A. intestini* RYC-MR95. Para evitar problemas de reacciones cruzadas entre las recombinasas se eligieron aquellos fragmentos que mostraban el mayor grado de divergencia entre ellas.

Los primeros resultados mostraron que las cepas sensibles incluidas en el ensayo no mostraban señal de hibridación (posteriormente se comprobaría que esto no es cierto en todos los casos), lo que inicialmente excluía una gran diseminación de estos elementos genéticos entre los miembros de la familia *Acidaminococaceae*.

Sin embargo el resultado más sorprendente fue el hallazgo de más de una señal de amplificación en diferentes cepas de *A. intestini* y *A. fermentans*, tanto con el gen *dra1* como *dra2*, lo que permitió sospechar que en algunos casos, como *A. intestini* RYC-MR95 podrían existir dos copias de cada una de las recombinasas Dra-1 y Dra-2, mientras que la cepa *A.intestini* RYC-MR02 mostró solamente una única señal de hibridación para cada una de las sondas, sugiriendo una única copia del elemento. Sorprendentemente una situación intermedia se observó en la cepa de *A. fermentans* RYC-MR88 que portaba dos copias de Dra-2 y una única copia de Dra-1. Los resultados son resumidos en la tabla 3.

	Dra-1	Dra-2	Aci-1
RYC-MR95	2	2	1
RYC-MR88	2	1	1
RYC-MR02	1	1	1

Tabla 3.- Resultado de las hibridaciones con sondas para Dra-1, Dra-2 y Aci-1 frente a los genomas de las cepas RYC-MR95, RYC-MR88, RYC-MR02.

Este resultado obligó a reconsiderar el uso de la cepa empleada como referencia, pues si *A. intestini* RYC-MR95 podía presentar dos copias del elemento la estrategia de PCR inversa seguida hasta este momento podría dar lugar a falsos ensamblajes. Por lo tanto para facilitar el trabajo se optó por utilizar también a partir de este momento a la cepa RYC-MR02 como cepa de referencia para caracterizar el elemento que portaba el gen *bla_{aci1}*, siguiendo la misma estrategia de PCR inversa y PCR solapante. Así se llegaron a conocer 60 Kb flanqueando el gen *bla_{aci1}* (Figura 4).

IG-ACI-1

(*Acidaminococcus intestini* RYC-MR02)

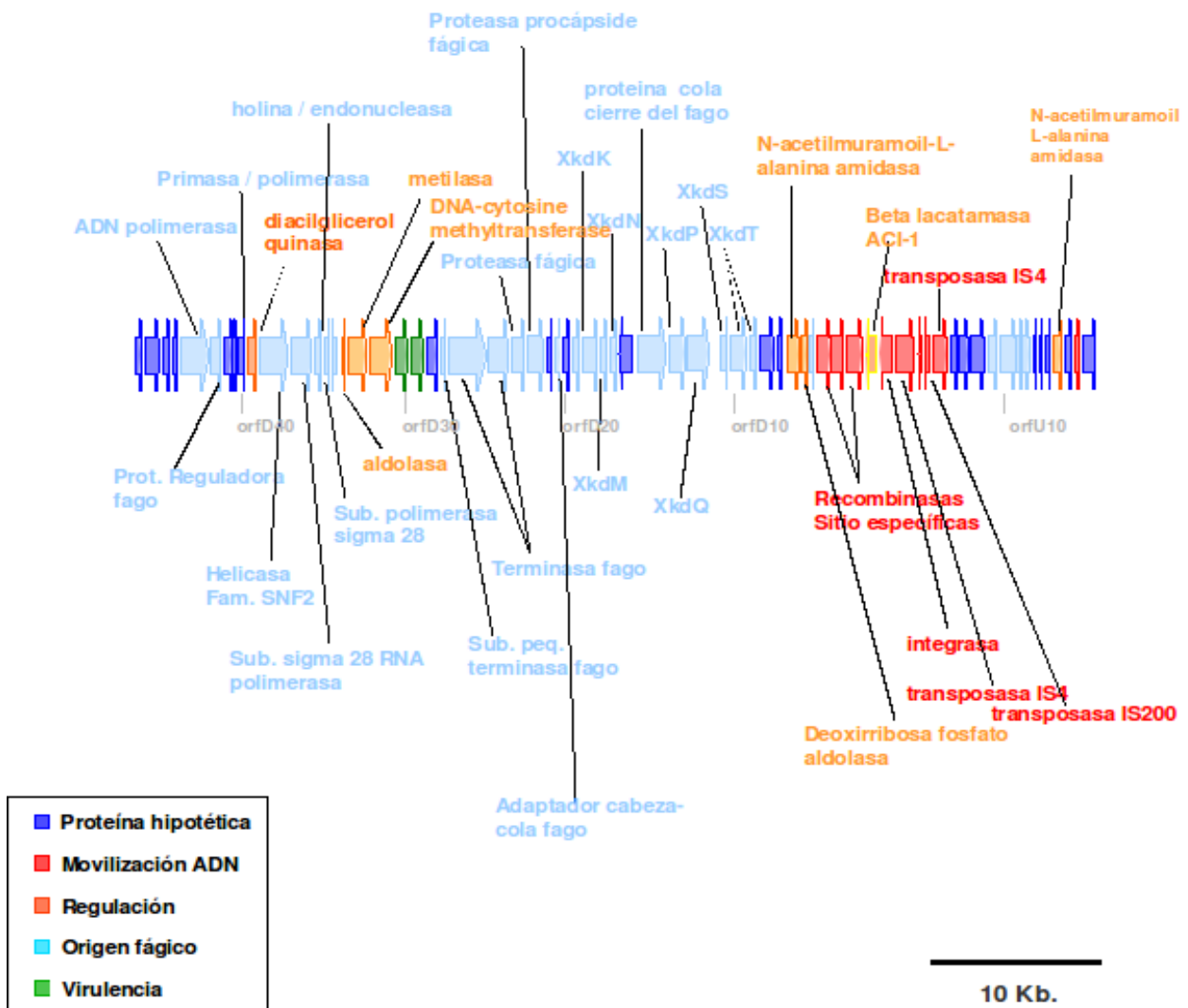


Figura 4.- Esquema de las 60 Kb de secuencia nucleotídica conocida alrededor del gen *bla_{aci1}* en *A.intestini* RYC-MR02.

Un total de 61 *orfs* fueron identificados en las 60 Kb más próximas al gen *bla_{aci1}*, de las que 45 presentaban homología con otras secuencias depositadas en las bases de datos (tabla 4). El hallazgo más llamativo fue la gran cantidad de *orfs* relacionados con virus bacteriófagos, sugiriendo el importante papel que habrían tenido los fagos en la construcción de esta estructura. Sin embargo resultaba difícil establecer un nexo evidente con un solo tipo o familia de fagos, pues diferentes *orfs* presentaban identidad con diferentes fagos, miembros mayoritariamente de la familia *Siphoviridae*, como ϕ 315 descrito en *S.pyogenes* y asociado al gen *mef* que confiere resistencia a macrólidos (17) o de la familia *Myoviridae* descrito en *Vibrio spp.* Pero, probablemente, el mayor número de *orfs* con alta homología con fagos son los *orfs xkdK-xkdM-xkdN-xkdP-xkdQ-xkdS-xkdT* relacionados con el fago defectivo PBSX descrito en *B. subtilis* (18).

Esta diversidad de elementos de origen fágico podría sugerir que la formación y evolución de esta estructura compleja difícilmente puede ser explicada si no es a través de la teoría modular de fagos (19).

El simple hallazgo de secuencias con identidad en las bases de datos permite intuir un fragmento de 10.918 pb. que incluye el gen *bla_{aci1}* y las serin-recombinasas previamente descritas, flanqueado por 2 *orfs* con homología a *xkdU* del fago defectivo PBSX (Tabla 4, figura 5), sin embargo, estos 2 *orfs* (identificados como 9D y 8U) no presentan homología entre sí sugiriendo orígenes evolutivos diferentes. Aunque resulte atractivo sugerir un evento de inserción de ese fragmento de 10.981 pb. con duplicación de las secuencias extremas (*orfs* homólogos), no encontramos evidencia definitiva que pruebe tal hipótesis.

<i>orf</i>	Descripción	Módulo	(nt)	(aa)	Mayor porcentaje identidad	
43D	Prot. Hipotética		186	62	<i>Actinobacteria</i>	ZP_03922347.1 [Corynebacterium pseudo-genitalium ATCC 33035]
42D	ADN polimerasa I	Regulación	1986	662	<i>Firmicutes</i>	NP_976705.1 [Bacillus cereus ATCC 10987]
41D	Prot. Hipotética		660	220	<i>Firmicutes</i>	YP_001681458.1 [Heliobacterium modesticaldum Ice1]
40D	Prot. Hipotética		219	73	<i>Firmicutes</i>	YP_001321792.1 [Alkaliphilus metalliredigens QYMF]
39D	Prot. Hipotética		477	159	<i>Firmicutes</i>	ZP_04803528.1 [Clostridium cellulovorans 743B]
38D	Primasa	Regulación	2241	747	<i>Firmicutes</i>	ZP_04803527.1 [Clostridium cellulovorans 743B]

37D	Diacilglicerol quinasa	Regulación	375	125	<i>Firmicutes</i>	ZP_02170287.1 [Bacillus selenitireducens MLS10]
36D	Helicasa SNF2	Regulación / origen fágico	1368	456	<i>Chloroflexi</i>	YP_181811.1 [Dehalococcoides ethenogenes 195]
35D	Sub. γ^{28} ARN polimerasa	Regulación / origen fágico	447	149	<i>Firmicutes</i>	ZP_02171971.1 [Bacillus selenitireducens MLS10]
34D	Holina / endonucleasa	Regulación / origen fágico	375	125	<i>Firmicutes</i>	AAT72373.1 [Streptococcus pyogenes MGAS10394]
33D	Sub. γ^{28} ARN polimerasa	Regulación / origen fágico	402	134	<i>Firmicutes</i>	YP_001917481.1 [Natranaerobius thermophilus JW/NM-WN-LF]
32D	Deoxirribosa fosfato aldolasa	Regulación	237	79	<i>Firmicutes</i>	ZP_01966919.1 [Ruminococcus torques ATCC 27756]
31D	Metilasa	Regulación	1233	411	<i>Firmicutes</i>	YP_060462.1 [Streptococcus pyogenes MGAS10394]
30D	ADN citosina metiltransferasa	Regulación	1575	525	<i>Firmicutes</i>	ZP_04803518.1 [Clostridium cellulovorans 743B]
29D	Factor Virulencia	Virulencia	861	287	<i>Chloroflexi</i>	YP_180817.1 [Dehalococcoides ethenogenes 195]
28D	Factor Virulencia	Virulencia	894	298	<i>Firmicutes</i>	ZP_04528957.1 [Clostridium butyricum]
27D	Prot. Hipotética		699	233	<i>Firmicutes</i>	YP_516268.1 [Desulfitobacterium hafniense Y51]
26D	Sub. Peq. terminasa	Origen fágico	378	126	<i>Firmicutes</i>	YP_060460.1 [Streptococcus pyogenes MGAS10394]
25D	Terminasa	Origen fágico	2571	857	<i>Firmicutes</i>	YP_001038136.1 [Clostridium thermocellum ATCC 27405]
24D	Sub. grande terminasa	Origen fágico	1254	418	<i>Firmicutes</i>	YP_060458.1 [Streptococcus pyogenes]
23D	Proteasa fágica	Origen fágico	738	246	<i>Chloroflexi</i>	YP_181801.1 [Dehalococcoides ethenogenes 195]
22D	Proteasa procápside	Origen fágico	1188	396	<i>Firmicutes</i>	YP_060456.1 [Streptococcus pyogenes MGAS10394]
21D	Prot. Hipotética		279	93	<i>Firmicutes</i>	ZP_02041551.1 [Ruminococcus gnavus ATCC 29149]
20D	Adaptador cabeza-cola	Origen fágico	345	115	<i>Firmicutes</i>	YP_001392477.1 [Clostridium botulinum]
19D	Prot. Hipotética		417	139	<i>Firmicutes</i>	YP_001320231.1 [Alkaliphilus metalliredigens QYMF]
18D	Prot. Hipotética		438	146	<i>Firmicutes</i>	YP_001087859.1 CD1362 [Clostridium difficile 630]

17D	XkdK	Origen fágico	1080	360	<i>Firmicutes</i>	YP_001310480.1 [Clostridium beijerinckii NCIMB 8052]
16D	XkdM	Origen fágico	417	139	<i>Firmicutes</i>	NP_782683.1 [Clostridium tetani E88]
15D	XkdN	Origen fágico	693	231	<i>Firmicutes</i>	ZP_05373537.1 [Geobacillus sp. Y4.1MC1]
14D	Tallo fágico	Origen fágico	2118	706	<i>Firmicutes</i>	YP_002863280.1 [C. botulinum Bf]
13D	XkdP	Origen fágico	732	244	<i>Firmicutes</i>	NP_782679.1 [C. tetani E88]
12D	XkdQ	Origen fágico	1527	509	<i>Fusobacteria</i>	ZP_00144949.1 [Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii ATCC 49256]
11D	XkdS	Origen fágico	453	151	<i>Firmicutes</i>	NP_782677.1 [Clostridium tetani E88]
10D	XkdT	Origen fágico	1005	335	<i>Firmicutes</i>	NP_782676.1 [Clostridium tetani E88]
9D	XkdT	Origen fágico	546	182	<i>Firmicutes</i>	YP_001308788.1 [Clostridium beijerinckii NCIMB 8052]
8D	Glicerol 3P desH.	Regulación	855	285	<i>Firmicutes</i>	[C. scindens ATCC 35704]
7D	Prot. hipotética		243	81	<i>Firmicutes</i>	RUMTOR_01324 [Ruminococcus torques ATCC 27756]
6D	N-acetil muramoil L-alanina amidasa	Regulación	600	200	<i>Firmicutes</i>	N-acetilm. L-ala. amidase [Thermoanaerobacter teng-congensis MB4]
5D	Aldolasa	Regulación	393	130	<i>Firmicutes</i>	ZP_02170292.1 [Bacillus selenitireducens MLS10]
4D	Lisina fágica	Orig. fágico	201	66	<i>Firmicutes</i>	ABV55413.1 [Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis]
3D	DRA2	Movilización	646	215	<i>Firmicutes</i>	Recombinasa [S. pyogenes MGAS10394]
2D	DRA2*	Movilización	972	324	<i>Firmicutes</i>	[Thermoanaero-bacter sp. X514]
1D	DRA1	Movilización	1563	521	<i>Firmicutes</i>	YP_060442.1 [S. pyogenes MGAS10394]
<i>bla_{aci1}</i>	β-lactamasa	Res. antibiótico	855	284	<i>Firmicutes</i>	β-lactamasa <i>A. fermentans</i>
1U	Transposas	Movilización	855	284	<i>Firmicutes</i>	Transposasa IS3[Bacillus sp. B14905]
2U	Transposasa	Movilización	1377	458	<i>Firmicutes</i>	Transposasa [Clostridium tetani E88]
3U	Transposasa	Movilización	234	77	<i>Firmicutes</i>	Transposasa [Bacillus cereus subsp. cytotoxis NVH 391-98]

4U	Transposasa IS4	Movilización	414	137	Actinobacteria	Transposasa, IS4 [Frankia sp. CcI3]
5U	Prot. Hipotética		363	121	<i>Firmicutes</i>	EUBVEN_02755 [Eubacterium ventriosum ATCC 27560]
6U	Prot. Hipotética		930	310	<i>Firmicutes</i>	RUMOB_E_00760 [Ruminococcus obeum ATCC 29174]
7U	Prot. Hipotética		417	139	<i>Chloroflexi</i>	DET1117 [Dehalococcoides ethenogenes 195]
8U	XkdT/U	Origen Fágico	588	196	<i>Firmicutes</i>	XkdT [Geobacillus sp. Y4.1MC1]
9U	gp12	Origen Fágico	1185	395	Proteobacteria	gp12 [Vibrio phage KVP40]
10U	Port. fágica	Origen Fágico	657	219	<i>Firmicutes</i>	phage structural protein [Mitsuokella multacida DSM 20544]
11U	Tallo-collar fago	Origen Fágico	255	85	<i>Acidobacteria</i>	phage tail Collar [Koribacter versatilis Ellin345]
12U	Port. Hipotética		183	61	<i>Firmicutes</i>	predicted protein [Acidaminococcus sp. D21]
13U	Prot. Hipotética		288	96	<i>Firmicutes</i>	hypothetical protein VEIDISOL_00738 [Veillonella dispar ATCC
14U	N-acetilmuramoil Ala-amidasa	Regulación	537	179	<i>Firmicutes</i>	putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Mitsuokella multacida DSM 20544]
15U	Prot. Hipotética		522	174	<i>Firmicutes</i>	hypothetical protein MmulD2_00810 [Mitsuokella multacida DSM 20544]
16U	Nucleasa	Regulación	258	86	<i>Actinobacteria</i>	ParB-like nuclease [Cryptobacterium curtum DSM 15641]
17U	Prot. Hipotética		936	312	<i>Proteobacteria</i>	hypothetical protein Bcep18194_B3079 [Burkholderia sp. 383]

Tabla 4.- Listado de los *orfs* de la cepa *A. intestini* RYC-MR02 tras secuenciar 60 Kb del entorno del gen *bla_{aci1}*.

La nomenclatura establecida pretende simplemente facilitar su descripción, eligiéndose números consecutivos tomando como origen la β -lactamasa *bla_{aci1}* y las letras corresponden a las siglas inglesas *Downstream* (aguas abajo) o *Upstream* (aguas arriba).

A partir de la secuencia inicial de 60Kb en *A. intestini* RYC-MR02, se diseñaron cebadores específicos que permitieran amplificar y localizar mediante PCRs solapantes la presencia de estos fragmentos en la cepa original de *A. intestini* RYC-MR95.

IG-ACI-1

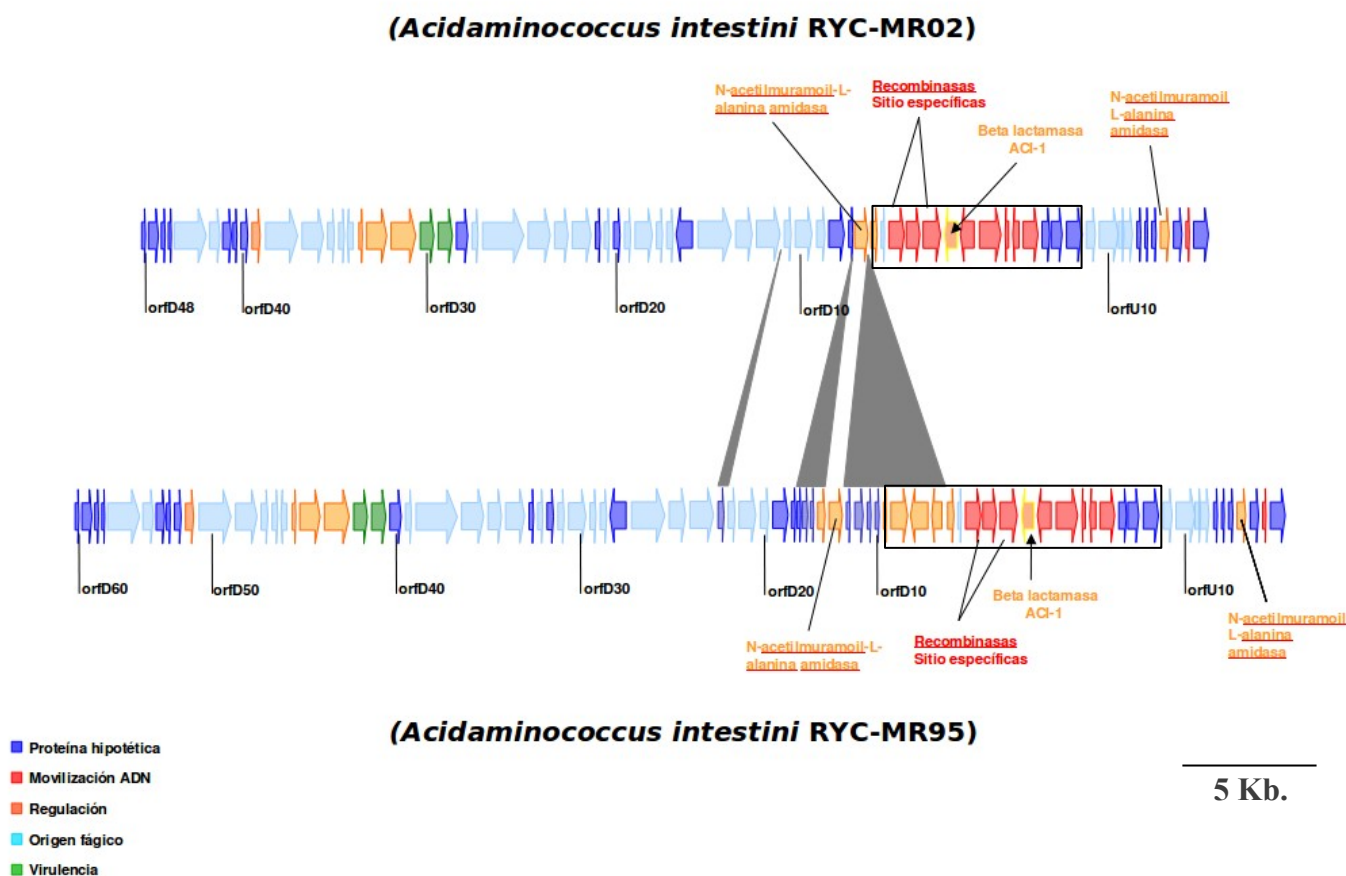


Figura 5.- Esquema comparativo de las estructuras complejas que portan el gen *bla_{aci1}* y las serin-recombinasas, *dra1* y *dra2*, en las cepas *A.intestini* RYC-MR02 y *A.intestini* RYC-MR95. La caja indica el fragmento central (ver texto).

Los fragmentos que rindieron amplificación positiva fueron secuenciados. Como consecuencia se pudo realizar un análisis de genómica comparada entre ambas cepas, el cual se muestra en la figura 5. De esta figura se deduce que existe una estrecha relación evolutiva entre ambas estructuras con tan solo 12 *orfs* presentes en *A. intestini* RYC-MR95 y ausentes en *A. intestini* RYC-MR02, mientras que ningún *orf* presente en *A. intestini* RYC-MR02 estaba ausente en *A. intestini* RYC-MR95. Este hallazgo permite inferir que ambas estructuras no derivaron de una estructura ancestral común, sino que una deriva de la otra, aunque aún no podemos establecer una direccionalidad en el proceso evolutivo entre ambas estructuras. Llamaremos a partir de este

momento IG-ACI-1 a la isla genética que se está describiendo.

La disponibilidad de una cepa de *A. fermentans*, la especie filogenéticamente más próxima a *A. intestini* resistente a los antibióticos β -lactámicos debido a la presencia del gen *bla_{aci1}*, permitió comprobar si esta estructura compleja de 60 Kb portando el gen *bla_{aci1}* estaba también presente en *A. fermentans*. En esta ocasión la confirmación se realizó exclusivamente mediante PCRs solapantes sin posterior secuenciación de los productos amplificados. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 6. De éstos se deduce que el gen *bla_{aci1}* en la cepa *A. fermentans* RYC-MR88 está en un fragmento relacionado con las cepas *A. intestini* RYC-MR02 y RYC-MR95, pero evolutivamente más alejado a IG-ACI-1 atendiendo al número de *orfs* no detectados en la cepa *A. fermentans* RYC-MR88.

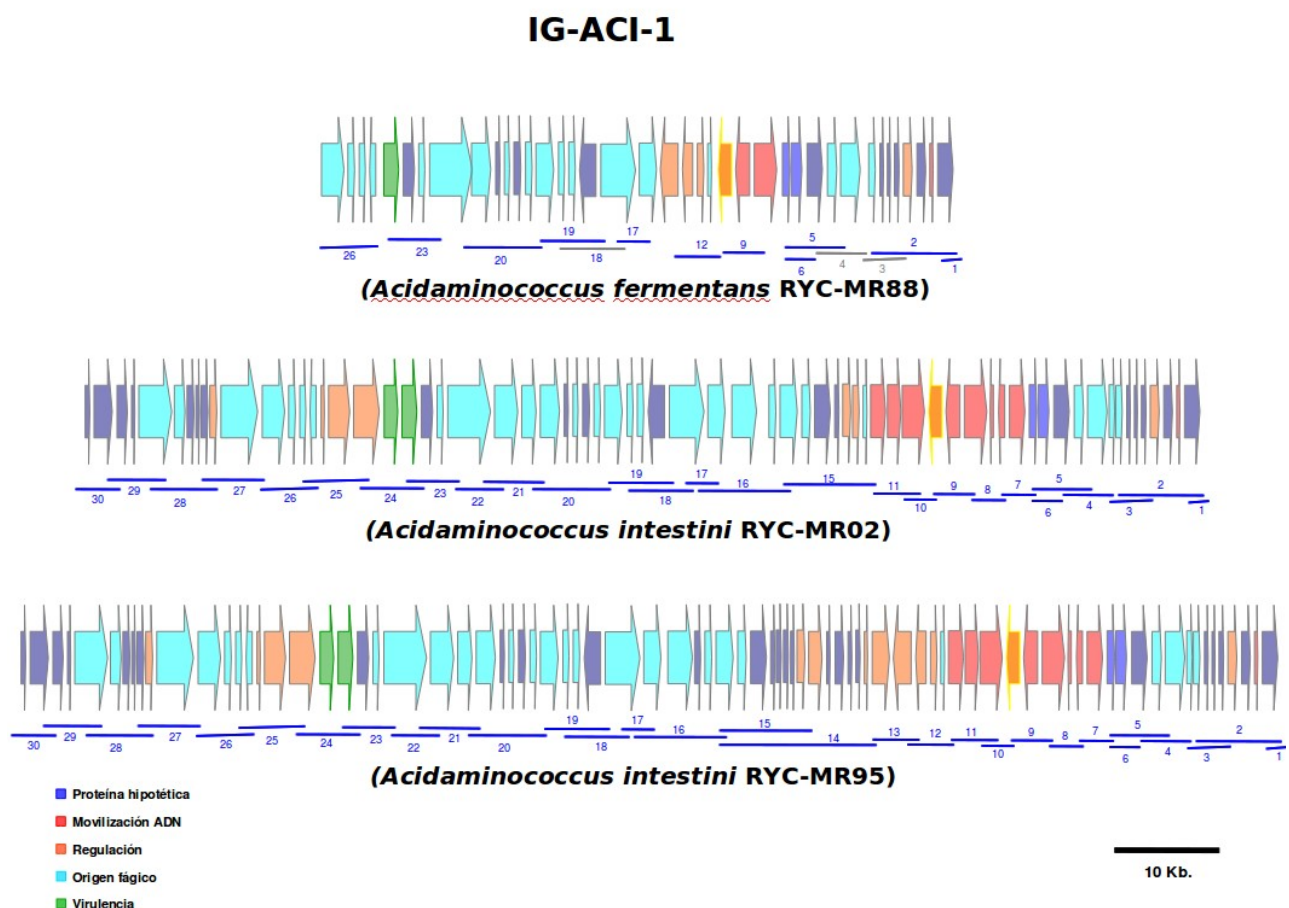


Figura 6.- Esquema comparativo de las estructuras encontradas en *A. intestini* RYC-MR95, *A. intestini* RYC-MR02 y *A. fermentans* RYC-MR88 basados en resultados de PCRs solapantes.

La presencia de la estructura génica IG-ACI-1 en cepas de *Acidaminococcus* pertenecientes a las 2 especies bacterianas descritas, *A. fermentans* y *A. intestini* sugiere dos hipótesis de trabajo:

- Que estas estructuras genéticas complejas existían antes de la diversificación de *Acidaminococcus* en *A. fermentans* y *A. intestini*. La inmensa mayoría de las cepas de ambas especies debería ser resistente a los β -lactámicos o al menos debería poder detectarse la presencia del gen *bla_{aci1}*.
- Que estas estructuras fueron elementos genéticos móviles que llegaron por transferencia horizontal a diferentes cepas de ambas especies de *Acidaminococcus* desde especies bacterianas evolutivamente próximas con las que compartían un mismo nicho ecológico. En esta hipótesis deberíamos encontrar estructuras similares en especies bacterianas evolutivamente relacionadas con *Acidaminococcus*.

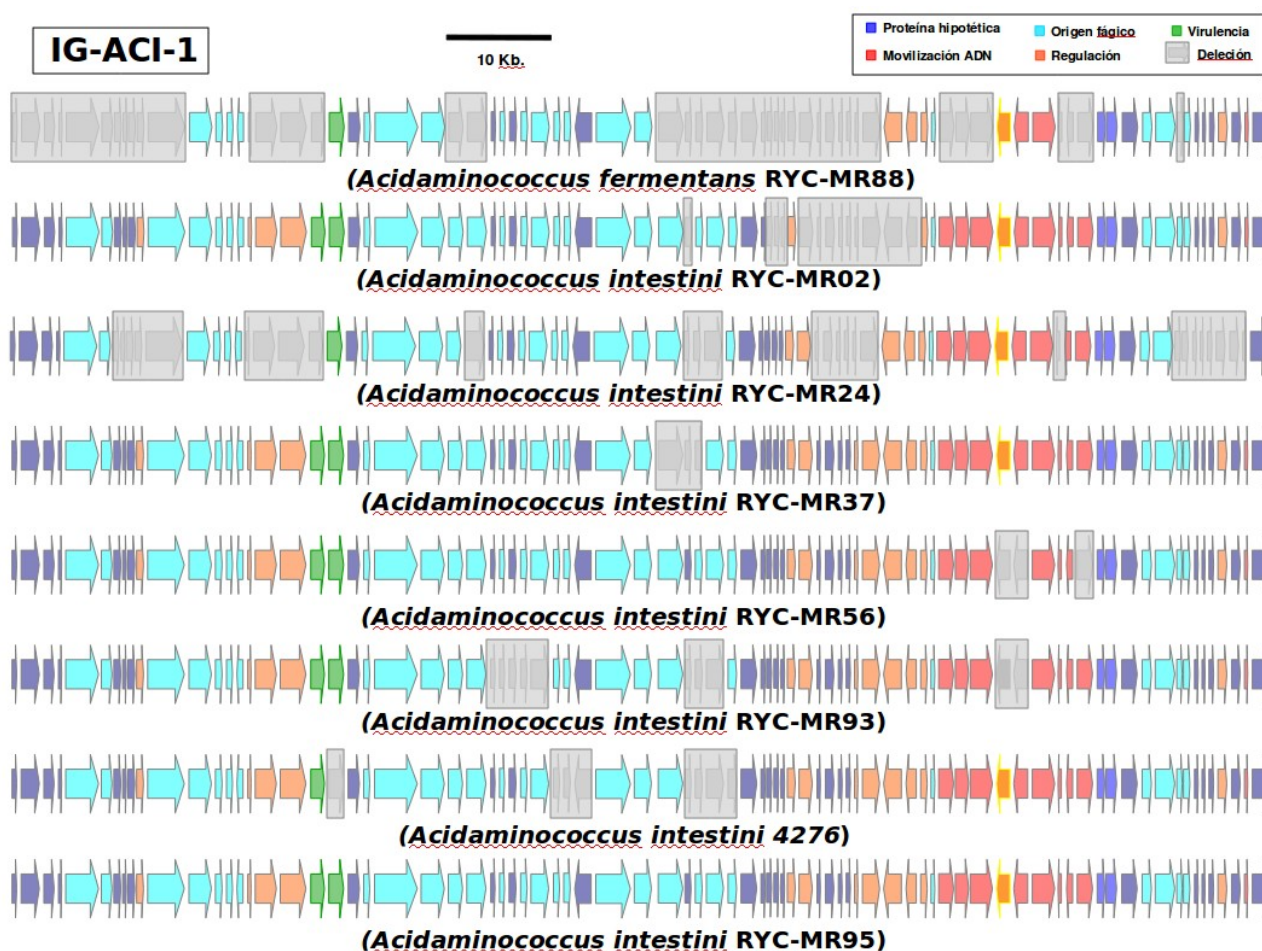


Figura 7.- Esquema comparativo de las estructuras génicas IG-ACI-1 encontradas en todas las cepas clínicas de *A. intestini* y *A. fermentans* basado en el resultado de un total de 30 PCRs solapantes.

Aunque existen cepas de *A. fermentans* y *A. intestini* resistentes a los antibióticos β -lactámicos, este fenotipo no corresponde con el fenotipo mayoritario dentro de este género bacteriano (tabla 1), sin embargo, al realizar el estudio de PCR solapantes con cepas de *Acidaminococcus* sensibles y resistentes a los β -lactámicos nos encontramos con que en ambos tipos de cepas la estructura IG-ACI-1 esta presente (Figura 7). En aquellas cepas sensibles a los β -lactámicos falta tan solo el gen *bla_{aci1}* y la IS perteneciente a la familia de las IS3 e identificada en la tabla 4 como 1U. Estos datos sugieren la posibilidad de que la captación de IS3 / *bla_{aci1}* fuera un evento de transferencia horizontal no relacionado con el proceso evolutivo de la estructura IG-ACI-1.

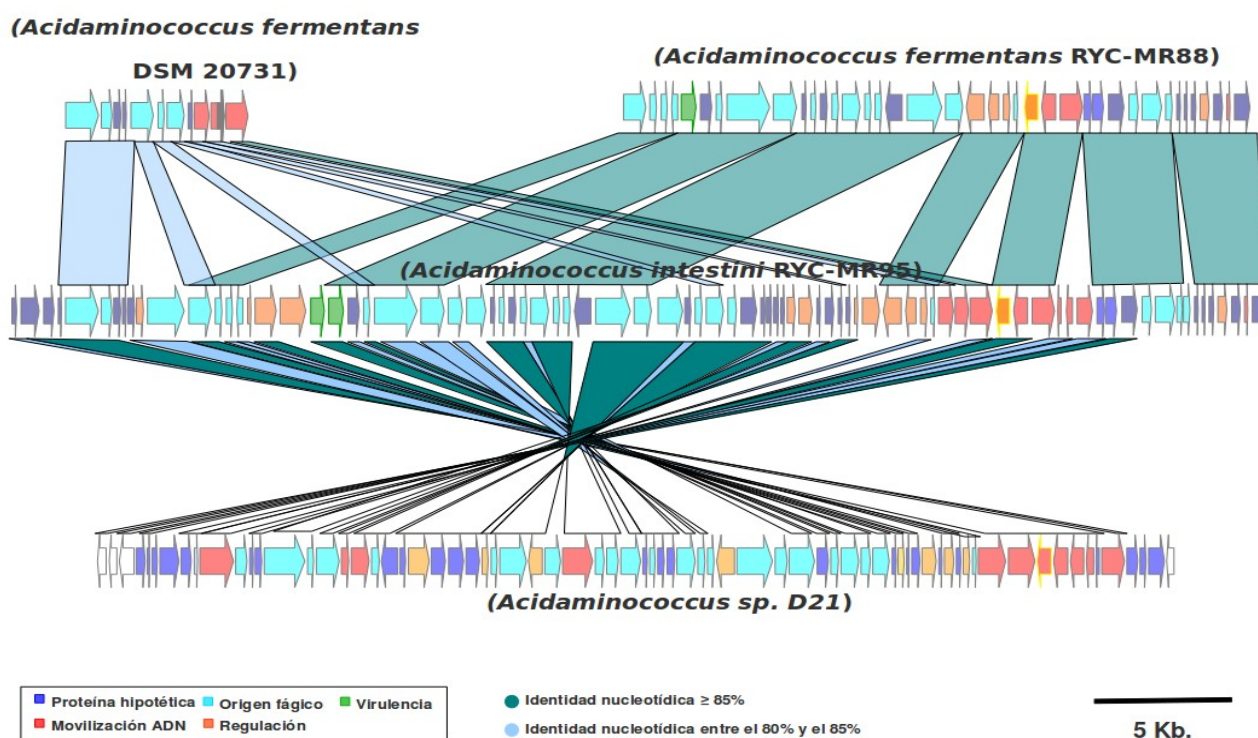


Figura 8.- Se identificó una región de 55.797 pb. con alta identidad con IG-ACI-1 (91,12% a nivel nucleotídico) en *Acidaminococcus* sp. D21. Se muestran también las identidades con regiones presentes en *A. fermentans* DSM 20731 y *A. fermentans* RYC-MR88.

Por otra parte, buscamos la presencia de la estructura IG-ACI-1 en otras especies evolutivamente próximas a *Acidaminococcus* o con aquellas que comparta un mismo nicho ecológico (como flora anaerobia intestinal). De acuerdo con esta hipótesis el fragmento conocido de 60Kb se utilizó para cruzar esta información con las bases de datos en la *Nucleotide Database*

Collection del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Dentro del proyecto internacional de secuenciación del microbioma humano la secuenciación de la cepa *Acidaminococcus* sp. D21 (NZ_ACGB000000000, del *contig* 1.1) mostró una alta homología con el fragmento de 60Kb encontrado en las cepas clínicas de nuestra colección (Figura 8)

Por el contrario, tan solo 11 *orfs* del fragmento de 60Kb fueron encontrados en la cepa de *A. fermentans* DSM 20731, única cepa de esta especie cuya secuencia había sido publicada hasta la fecha (20). Estos 11 *orfs* se encontraban dispuestos consecutivamente en una región genómica de unas 7 Kb., sugiriendo una relación evolutiva entre ambas estructuras. En este momento, no podemos inferir si se trata de un proceso de reducción genómica de un elemento que se adquirió o por el contrario una secuencia ancestral que posteriormente ganó nuevas secuencias génicas.

Además, recientemente se ha presentado el genoma de *Phascolarctobacterium* YIT 12067 (21) perteneciente a la familia *Acidaminococcaceae*, y en él se pudo identificar en este trabajo la presencia del gen *bla_{aci1}*. En la figura 9 puede observarse la región en el genoma de esta especie que se corresponde con IG-ACI-1.

En *Phascolarctobacterium* se ha identificado tanto *bla_{aci1}* como el sistema de doble recombinasa, y las secuencias de inserción adyacentes hacia el extremo 3'. Del mismo modo aparece un *orf* de origen fágico hacia 5'. El *locus* de inserción de esta estructura en el genoma de *Phascolarctobacterium* difiere del lugar de inserción en *Acidaminococcus*.

El descubrimiento de esta estructura en particular lleva a pensar en la naturaleza modular del elemento estudiado, el cual se haya constituido posiblemente merced a la sucesiva acreción de varios elementos transponibles, así como, y esto parece de mayor importancia, a la naturaleza móvil del mismo o de partes del mismo.

Si el elemento ha sido adquirido o no, total o parcialmente, por *Acidaminococcus* y otras especies mediante transferencia génica horizontal en algún momento reciente de la evolución, no formando parte entonces del acervo genético ancestral de esta estirpe de bacterias anaerobias, es un aspecto que continuará tratándose en los estudios cuyo resultado aparece en la sección 2.6.

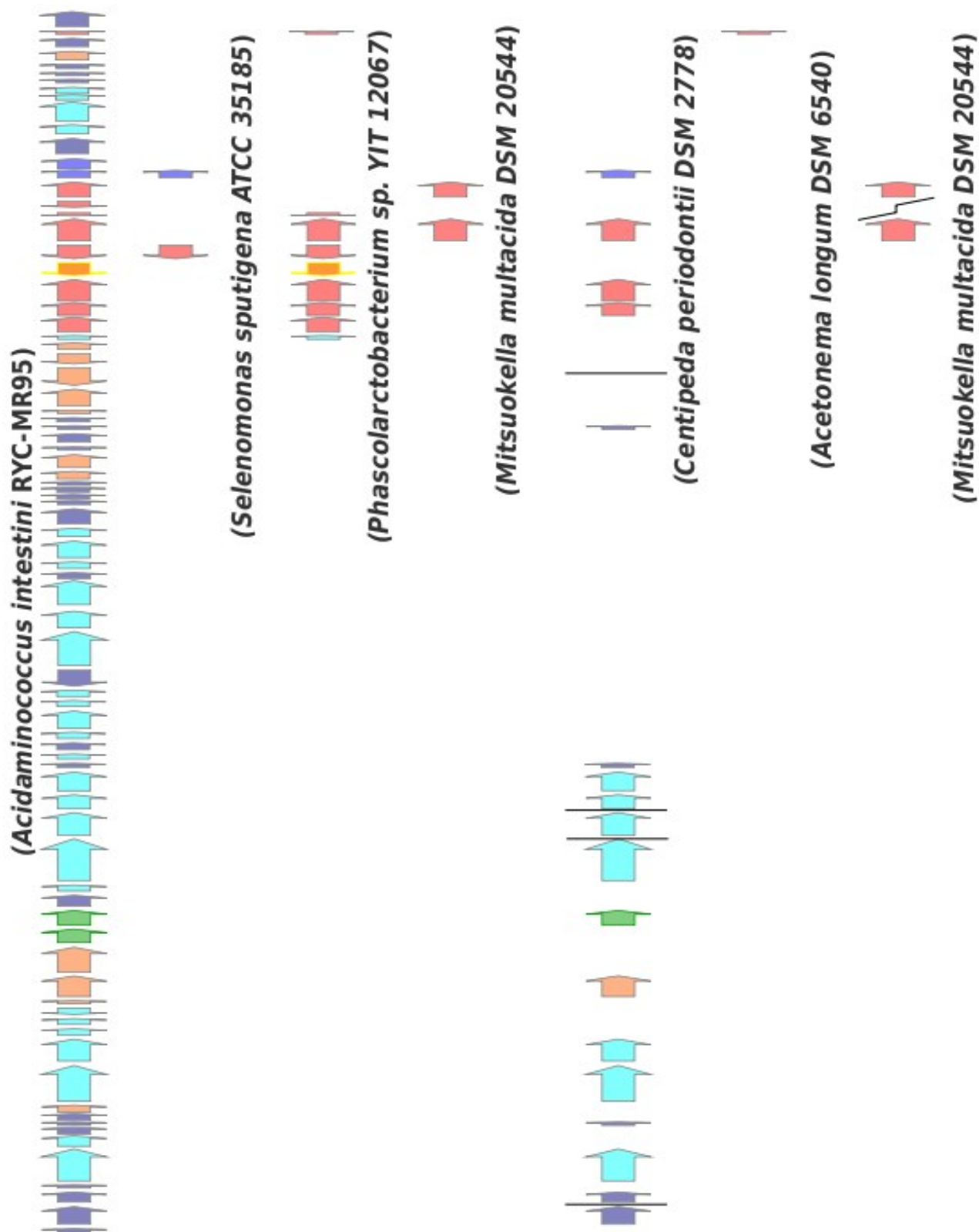


Figura 9.- Secuencias génicas relacionadas con la estructura IG-ACI-1 en especies bacterianas filogenéticamente más próximas a *Acidaminococcus* (criterio de identificación de secuencia sea >80%, si existe un descenso en el número de secuencias encontradas cuanto más se aleje de *Acidaminococcus*, rebajar el criterio de exclusión a 70 y 60%). Las líneas verticales indican *loci* de inserción diferentes.

2.3.- Estudios de genómica comparada: determinación de las marcas de integración de IG-ACI-1.

La aparición en las bases de datos de la secuencia del genoma completo de *Acidaminococcus* sp D21 (22), permitió utilizar estos datos para llevar a cabo estudios de genómica comparada. Se pudo así identificar una secuencia de 67 pb. directamente repetidas flanqueando el elemento IG-ACI-1 de ~60 Kb (figura 11).

Si el mecanismo de integración de IG-ACI-1 responde a una integración sitio-específica, a tenor de las secuencias *dra-1* y *dra-2* descritas en este elemento, el hallazgo de estas marcas sugería que podría tratarse de la secuencia diana reconocida en el proceso de integración del elemento IG-ACI-1, y por tanto delimitaría los extremos del mismo. Resulta igualmente plausible suponer que la integración de IG-ACI-1 ocurrió en el mismo *locus* en el genoma de ambas cepas.



Figura 11.- Alineamiento múltiple mediante ClustalW de las secuencias de 67 pb. localizadas en los extremos hipotéticos del elemento. **a)** Secuencia localizada en el extremo 5' del elemento en *A. intestini* RYC-MR95. **b)** Secuencia localizada en el extremo 3' del elemento en *A. intestini* RYC-MR95. **c)** Secuencia localizada en el extremo 5' del elemento en *A. sp.* D21. **d)** Secuencia localizada en el extremo 3' del elemento en *A. sp.* D21.

Ocurre que estas secuencias están solo muy parcialmente conservadas, pues hay una divergencia importante a nivel de secuencia nucleotídica entre ellas. Por lo tanto, no podemos afirmar que la secuencia encontrada en el extremo 5' sea la misma que la encontrada en el extremo 3'. Así pues, todavía no se pudieron dar por fijados los extremos del elemento.

Se continuó secuenciando más allá hacia los extremos de IG-ACI-1 en la cepa modelo. Al comparar los nuevos fragmentos obtenidos con el genoma de *Acidaminococcus* sp. D21 (ahora disponible), se observa que en esta última cepa no existe coincidencia alguna.

Esto significa que en D21 el elemento es más corto, es decir, se limita a lo descrito hasta ahora, mientras que en las cepas modelo (RYC-MR95 y RYC-MR02) parece ser de mayor longitud. Se procedió comprobando la existencia o no en *Acidaminococcus sp.* D21 de cada nuevo fragmento obtenido. En el momento que apareciese coincidencia de secuencia, se esperaba encontrar el extremo final del elemento.

De este modo, se encontró una secuencia de 54 pb. (figura 12) que aparecía tanto en la cepa modelo como en D21. Si se continuaba secuenciando en la cepa modelo, los fragmentos obtenidos ya existían en D21. Igualmente, se comprobó que la secuencia de 54 pb. tenía, como era de esperar, dos copias, una situada aguas arriba (extremo 5') y otra aguas abajo (extremo 3') del elemento IG-ACI-1.

Ambas secuencias tienen entre sí una identidad estadísticamente suficiente (>75% a nivel nucleotídico) como para afirmar que son una misma secuencia directamente repetida. Son por tanto los límites exactos del elemento IG-ACI-1. El análisis de las secuencias inmediatamente flanqueantes con IG-ACI-1 permitió deducir el *locus* en que se encontraba la isla genética, por comparación con el genoma de la cepa D21, así como el *locus* ocupado en D21 por el fragmento interno de ~60Kb que tiene identidad de secuencia con IG-ACI-1. La figura 13 resume gráficamente lo expuesto, para mayor claridad.



Figura 12.- Alineamiento mediante BLAST de las secuencias de 54 pb. localizadas en los extremos de IG-ACI-1 en *A. intestini* RYC-MR95. **a)** Secuencia localizada en el extremo 5'. **b)** Secuencia localizada en el extremo 3'.

Al comparar la secuencia completa de IG-ACI-1 con la del *contig* 1.1 de *Acidaminococcus sp.* D21, se observa que únicamente coinciden en la mencionada región conservada de 60 Kb. En IG-ACI-1, esta región se localiza entre las posiciones 36.632 y 92.429 (en pb.) del elemento.

En cuanto a los límites del elemento en *Acidaminococcus sp.* D21, únicamente se reconoce la secuencia de 67 pb. que, como ya hemos explicado, su divergencia de secuencia impide que

podamos afirmar que sean una verdadera diana de inserción. El hecho de que, fuera de estos límites, encontremos secuencia que sabemos es cromosómica, es el único argumento, junto con la identidad con IG-ACI-1, que permite definir este elemento como tal.

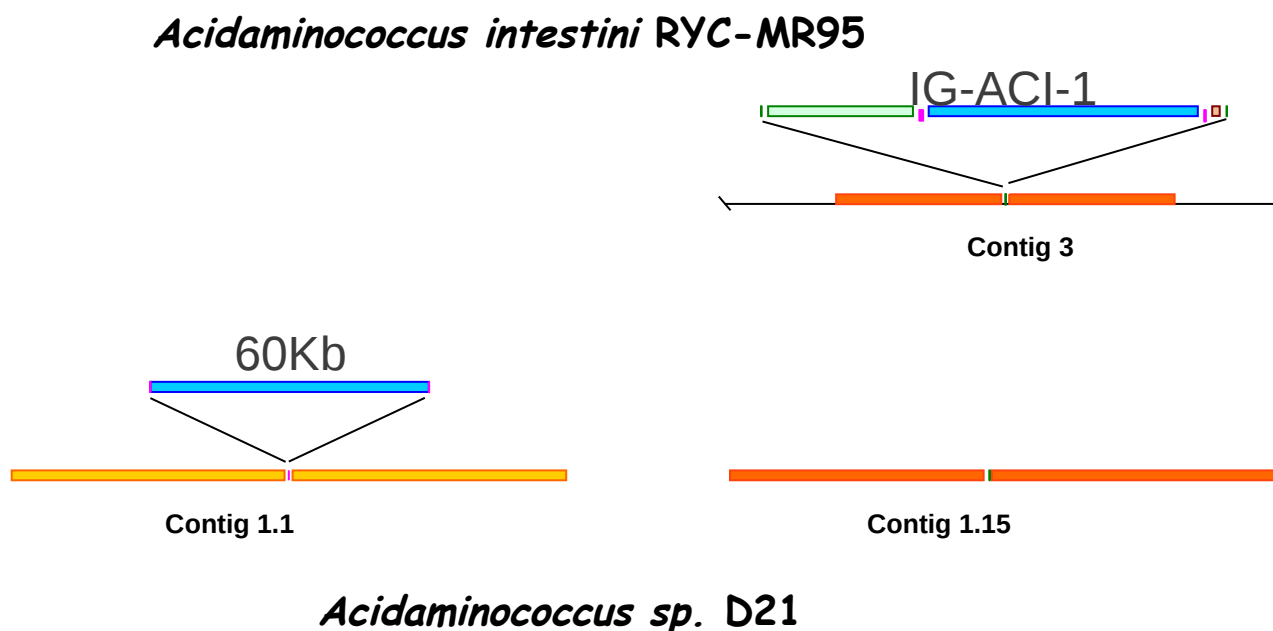


Figura 13.- Esquema de los elementos descubiertos y su localización en *A. intestini* RYC-MR95 y en *Acidaminococcus* sp. D21. El elemento IG-ACI-1 (100681 pb.) se localiza en el Contig 3 del genoma de *A. intestini* RYC-MR95. El contig equivalente en el genoma de *Acidaminococcus* sp. D21 es el Contig 1.15. En este último no aparece el elemento IG-ACI-1, es decir, se encuentra vacío. No obstante, si aparece una copia de la secuencia de 54 pb. que se considera marca diana de la recombinación específica de sitio (señalada en ambas cepas con marcas verdes). Por otro lado, el elemento de 60 Kb. que tiene una identidad >70% a nivel nucleotídico con la región interna central de IG-ACI-1 (ambas en azul), se localiza en *Acidaminococcus* sp. D21 en el Contig 1.1. En rosa aparece la secuencia de 67 pb. que se descartó inicialmente como extremo del elemento, pero que flanquea la región de 60Kb. en ambos casos, y que en *Acidaminococcus* sp. D21 constituye el único límite reconocible.

El análisis de la secuencia de que se disponía localizada fuera de los extremos del elemento IG-ACI-1, permitió localizar aguas arriba del extremo 5' dos secuencias de lectura abierta correspondientes hipotéticamente a un regulador transcripcional de dos componentes. Está compuesto por una proteína sensora asociada a la actividad histidina quinasa y por un regulador transcripcional. Aguas abajo del extremo 3', se localiza un *orf* que codifica para una rubredoxina/ruberitrina, proteína relacionada con el metabolismo energético. Seguidamente a este *orf*, aguas abajo, encontramos una N-acetil γ -glutamil fosfato reductasa.

Una vez conocida la secuencia cromosómica en la que está insertado el elemento IG-ACI-1, podemos buscar este *locus* en el genoma de *Acidaminococcus* sp. D21. Éste se localizó en el *contig* 1.15 de dicho genoma (figura 13). En él, se localizó una única copia de la secuencia de 54 pb. (que recordemos flanqueaba IG-ACI-1), y una vez se analizó la región en la que se situaba esta copia única, se observa que corresponde exactamente con la región cromosómica en la que se localiza el elemento IG-ACI-1 en *A. intestini* RYC-MR95. De este modo, si se movilizase el elemento completo, se recompondría la región tal como existe en el *contig* 1.15. de *Acidaminococcus* sp. D21.

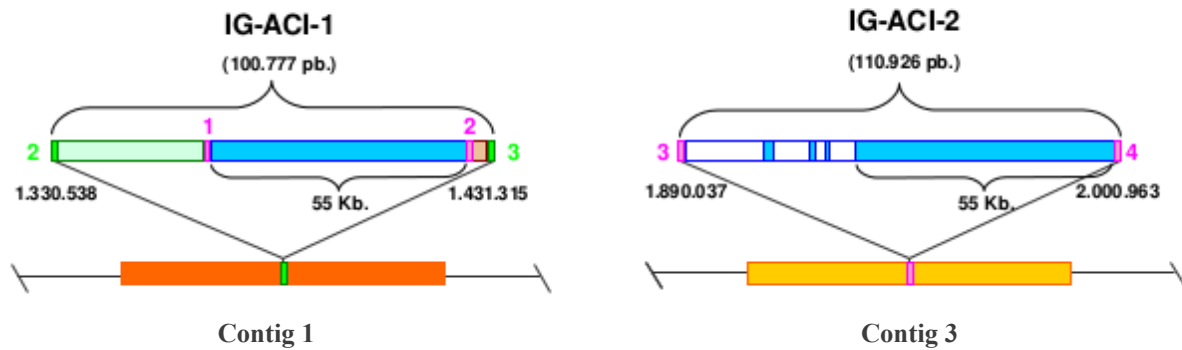
Los números de acceso en *Acidaminococcus* sp. D21 correspondientes con los *orf* del *locus*, son: ZP_03989032 (histidina quinasa), ZP_03989033 (regulador transcripcional), ZP_03989034 (rubredoxina/ruberitrina) y ZP_03989035 (N-acetil γ -glutamil fosfato reductasa).

Este fenómeno de duplicación de la secuencia diana tras la inserción, tal y como predecía la hipótesis de partida, puede reconstruirse claramente a la vista de estos datos. Así pues, quedó definido el punto de inserción del elemento, al encontrarse una cepa (*Acidaminococcus* sp. D21) con la secuencia diana aislada, localizada en una región concreta del cromosoma vacío, sin elemento móvil, y, por otro lado, otra cepa (*A. intestini* RYC-MR95), con ese mismo *locus* ocupado por el elemento IG-ACI-1.

Hasta este momento, se conocía pues el elemento completo IG-ACI-1 en *A. intestini* RYC-MR95, objeto central de la investigación, así como el *locus* cromosómico en el que se encuentra. Por otro lado, se ha descubierto ese mismo *locus* vacío en *Acidaminococcus* sp. D21, y al menos una de las regiones de IG-ACI-1 (la región conservada de 60 Kb.) ubicada en un *locus* diferente en el cromosoma de *Acidaminococcus* sp. D21.

Los resultados de hibridación (tablas 2 y 3) utilizando sondas correspondientes a las dos recombinasas sitio-específicas, que aparecían duplicadas, así como la existencia, como acabamos de deducir por análisis genómico, de al menos dos *locus* posibles para la inserción del elemento eran datos que aportaban mayor robustez a la hipótesis de que el elemento poseía dos copias en el genoma de *Acidaminococcus*.

***Acidaminococcus intestini* RYC-MR95**



***Acidaminococcus* sp. D21**



10 Kb.

Figura 14.- Esquema de los elementos descubiertos y su localización en *A. intestini* RYC-MR95 y en *Acidaminococcus* sp. D21. El Contig 3 de *Acidaminococcus intestini* RYC-MR95 se corresponde con el Contig 1.1 de *Acidaminococcus* sp. D21. En el Contig 3 de RYC-MR95 aparece el elemento denominado IG-ACI-2. En este último, aparece de nuevo una región similar a la región de ~60Kb. en posición central, flanqueada por secuencia no encontrada en ningún otro de los elementos ni en los *locus* cromosómicos estudiados (regiones en color blanco). Las dianas de inserción de este último elemento no pueden precisarse con exactitud, tan solo haciendo notar la presencia de secuencias similares a la secuencia de 67pb. (en rosa), cuyas divergencias de secuencia nuevamente impiden que podamos definirla como secuencia diana de la recombinación específica de sitio.

Utilizando la PCR inversa y confirmación posterior mediante PCR directa, se analizó el *locus* en RYC-MR95 que correspondería con el Contig 1.1 en *Acidaminococcus* sp. D21. En esta región, aparece una nueva copia de la región conservada de 60 Kb. (ver figura 14). Analizando el entorno genético de esta segunda región conservada de 60 Kb., se identificó un nuevo elemento genético, que llamaremos IG-ACI-2. Este segundo elemento tiene una longitud de 110.926 pb., siendo 10.148 pb. mayor que IG-ACI-1.

Se definió IG-ACI-2 al aparecer flanqueado por la secuencia directamente repetida de 67 pb., que, aunque poco consistente estadísticamente, hemos visto que efectivamente flanqueaba el elemento completo en *Acidaminococcus* sp. D21 (que consistía tan solo en la región conservada de 56 Kb.). No aparece aquí la marca genética de 54 pb., la cual define de modo preciso los límites de IG-ACI-1. La región conservada de 56 Kb. en uno y otro elemento (IG-ACI-1 e IG-ACI2) presentan una identidad a nivel nucleotídico del 84,3%. La de IG-ACI-2, tiene a su vez una identidad del 85,38% a nivel nucleotídico con la presente en el *contig* 1.1 de *Acidaminococcus* sp. D21. Se trató de localizar la secuencia flanqueante en otro genoma parcial presente en la base de datos, el de *A. fermentans* DSM 20731. Se pudo encontrar la Rubredoxina/Ruberitrina (NC_013740.1). Sin embargo, a pesar de que se localizaron cerca de este *orf* ciertos vestigios de la secuencia directamente repetida (datos no mostrados), no hay significación estadística suficiente para identificar estos vestigios como tal marca de inserción de la isla.

2.4 Organización genética de IG-ACI-1. Esbozo general de la anotación.

La anotación de los elementos descritos se llevó a cabo mediante la búsqueda bioinformática de las secuencias de lectura abierta (*orfs*) y la correspondiente identificación de los mismos por comparación de su secuencia nucleotídica y aminoacídica con las bases de datos. De este modo se identificaron 114 *orfs* en IG-ACI-1, 123 *orfs* en IG-ACI-2 y 71 *orfs* en el elemento de *Acidaminococcus* sp. D21. Los resultados del estudio comparativo a nivel nucleotídico y aminoacídico de la secuencia completa de los tres elementos pueden consultarse en el Apéndice A.

La región de ~60 Kb. (en azul en la figura 15) se organiza entorno a una zona central o “core” en la que se localiza la β -lactamasa ACI-1 (salvo en IG-ACI-2, que carece de ella), el sistema de doble recombinasa y los *orfs* correspondientes a varias secuencias de inserción (todo ello ya descrito con detalle en la sección 2.2). También se sitúan en esta región central conservada varios *orfs* relacionados con regulación genética, entre los que destacan dos N-acetilmuramoyl L-alanina amidasas, una glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y una metil adenina glicosilasa. Además, contiene otra región, aguas arriba de la central, que posee genes de origen fágico, en concreto, del bacteriófago defectivo de *Bacillus subtilis* PBSX (23). Por último, inmersa en la región de PBSX hay una zona diferenciada, con dos *orfs* relacionados con factores de virulencia, una aldolasa, una metilasa y una metiltransferasa, factores todos relacionados nuevamente con regulación genética.

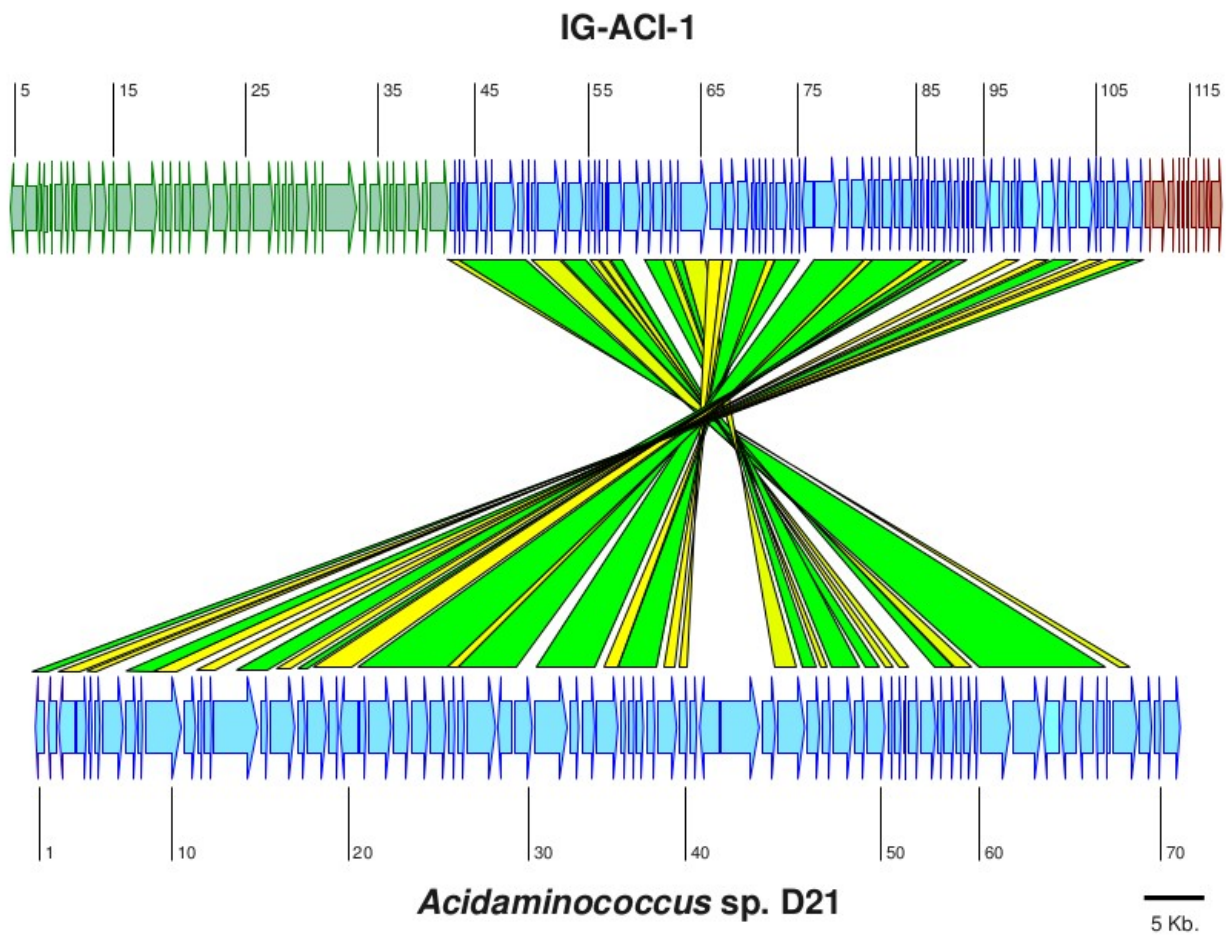


Figura 15.- Comparación a nivel nucleotídico entre el elemento IG-ACI-1 y su elemento equivalente en *Acidaminococcus* sp. D21. Se señalan las identidades mayores del 80%. En verde se representan los *orf* que tienen identidad a lo largo de toda su secuencia codificante. En amarillo se señalan los *orf* que tienen identidades parciales (no hay identidad a lo largo de la secuencia completa del *orf*).

IG-ACI-1

(*Acidaminococcus intestini* RYC-MR95)

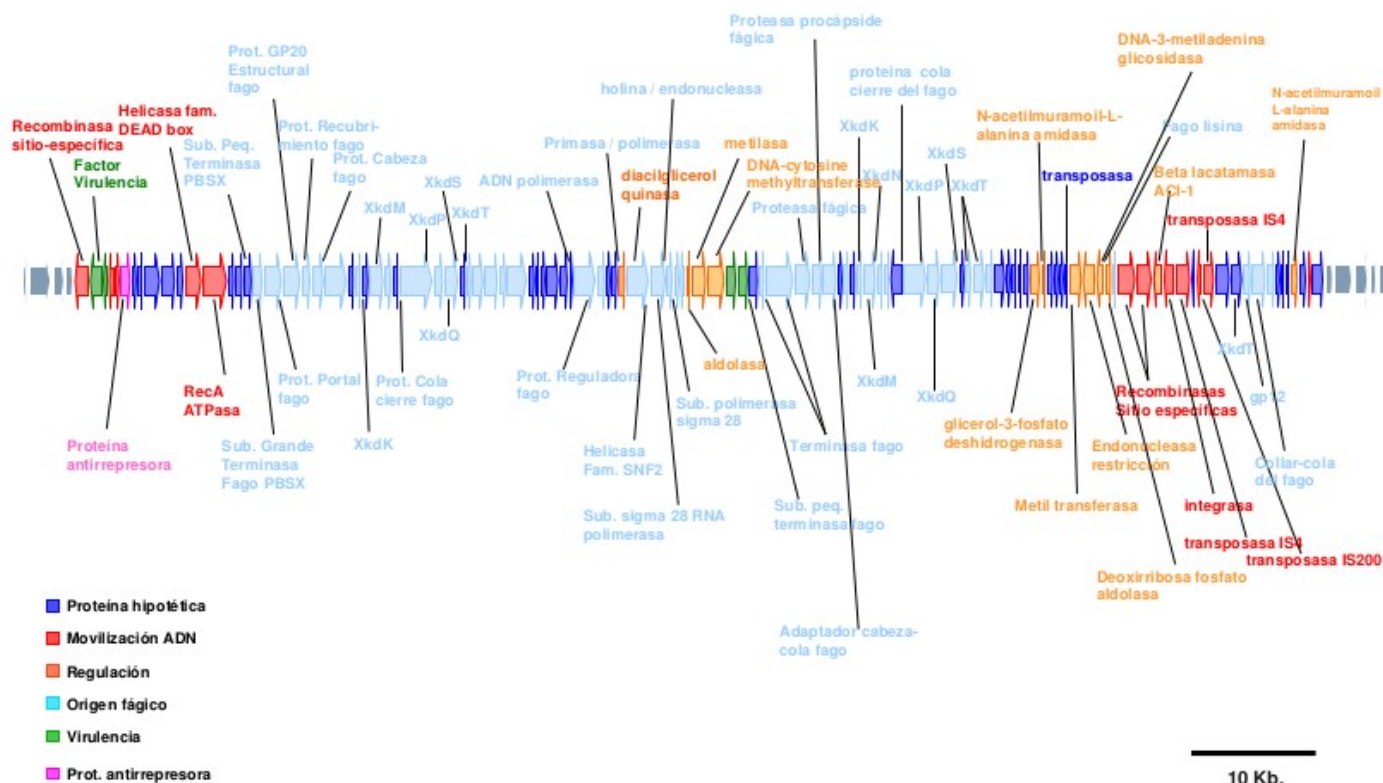


Figura 16.- Estructura del elemento IG-ACI-1. Se indican los diferentes *orf* identificados tras el proceso de anotación, clasificados por colores según su función hipotética o procedencia. El esquema completo del resto de los elementos estudiados puede verse en el Apéndice B:

Como puede apreciarse, en el resto del elemento hay también presencia muy importante de otros grupos de genes de origen fágico.

A continuación, se analizarán en detalle los genes más importantes. Se han agrupado los *orf* según su función hipotética, distinguiendo varios grupos:

a) β -lactamasas. El gen *bla_{aci1}* se corresponde en IG-ACI-1 con el *orf*102. El elemento IG-ACI-2 carece de β -lactamasa alguna, lo cual concuerda con los experimentos de hibridación con sondas para este gen. Sin embargo, el elemento de *Acidaminococcus* sp. D21 sí es portador de *bla_{aci1}*, situado en un *locus* similar al de IG-ACI-1.

b) Recombinasas. Ya se ha mencionado el sistema de dos recombinasas sitio-específicas dispuestas en tándem, precediendo a la β -lactamasa ACI-1 y separadas por una región espaciadora no codificante de 243 pb. Los genes de estas recombinasas son *dra1* (*orf100*) y *dra2* (*orf101*). Sus tamaños respectivos son 436 y 559 aminoácidos, pertenecen a la superfamilia de las serina recombinasas y su disposición en tándem constituye una estructura genética peculiar, relacionada sin duda con la movilización de todo el elemento genético.

% Identidad	R1	DRA1	DRA2	E2RT1a	E2RT2a	E2RT1b	E2RT2b	ART1	ART2
R1	-								
DRA1		-	34,4%	33%	58%	32,5%	66,6%	29,4%	66%
DRA2			-	61,4%	33%	75%	26,4%	87%	26,6%
E2RT1a				-	33%	61%	30%	61%	30%
E2RT2a					-	33,5%	56%	32,6%	56%
E2RT1b						-	31%	83%	31%
E2RT2b							-	29,5%	99%
ART1								-	30%
ART2									-

Tabla 5.- Comparativa a nivel de la secuencia de aminoácidos entre las recombinasas presentes en los elementos estudiados en el género *Acidaminococcus*. En azul se indican las recombinasas del elemento IG-ACI-1, en rojo las del elemento IG-ACI-2 y en naranja las del elemento de *Acidaminococcus* sp. D21. El guarismo indica el porcentaje de identidad entre dos secuencias. En color verde se señalan las parejas que presentan identidad a lo largo de la totalidad de sus secuencias. En el resto, el dato se refiere a identidades parciales (no aparean a lo largo de toda la secuencia).

Siguiendo en IG-ACI-1, su *orf5* se ha identificado también como una tirosina recombinasa específica de sitio. Se trata de una integrasa de 355 aminoácidos y de origen fágico (ϕ LC3 (24), fago de *Lactococcus*, sobre todo presente en bacterias Gram positivas). Posee un característico dominio catalítico carboxilo terminal con 6 sitios activos. Está igualmente relacionada con las recombinasas XerD/C (25). Su mecanismo de reacción es similar, siendo la tirosina la que lleva a cabo el ataque nucleofílico sobre la hebra sencilla que corta en el ADN dúplex. Esta recombinasa está presente en *Acidaminococcus* sp. D21 así como en *Veillonella*, el género más próximo a *Acidaminococcus*.

En IG-ACI-2 aparece el sistema de dobles recombinasas por duplicado, es decir, tenemos 4 recombinasas. El primer sistema es el constituido por el *orf6* (E2RT1a) y *orf7* (E2RT2a). El otro es el formado, aguas abajo, por los *orf64* (E2RT1b) y *orf65* (E2RT2b). En cuanto al elemento de *Acidaminococcus* sp. D21, tiene también una copia del sistema de dos recombinasas en tándem. Son los *orf61* (ART1) y *orf62* (ART2).

Según los datos de comparación de secuencia, efectuados mediante el programa BLAST, sabemos que DRA1, E2RT2a, E2RT2b y ART2 son la misma proteína. Por otro lado, DRA2, E2RT1a, E2RT1b y ART1 son iguales. El *orf5* de IG-ACI-1 es la única recombinasa que no tiene identidad alguna con cualquiera de las otras descritas.

c) Resto de *orfs* relacionados con movilización del ADN. Ya se han comentado en la previamente las transposasas e integrasas de las Secuencias de Inserción próximas a la β -lactamasa ACI-1. Por otra parte, el *orf16* de IG-ACI-1 (459 aa.) es una helicasa que contiene un dominio DEXDc (relacionado con los motivos DEAD-box y DEAH-box, entre otros). Este dominio es típico de una gran variedad de helicasas de la Superfamilia II (implicadas en recombinación) y proteínas relacionadas, capaces de desenrollar el ADN dúplex, traslocándose a lo largo del ADN merced a la energía libre obtenida de la hidrólisis de nucleósidos trifosfato.

El *orf17* (686 aa.) se trata de una ATPasa de la familia RecA (26), factor fundamental en el proceso de recombinación. Contiene el dominio de unión a nucleósidos trifosfato de las H⁺-ATPasas tipo F1 y V1 (familia RecA-like NTPases). Esta familia tiene también relación con sistemas de secreción tipo II y tipo IV, así como con proteínas del aparato de conjugación.

En cuanto a IG-ACI-2, su *orf1* (282 aa.) es una transposasa de la familia IS4 (27). Corresponde con el *orf64* de *Acidaminococcus* sp. D21. Se trata de un *orf* particularmente conservado en el género.

Varios *orf* en IG-ACI-2 y en *Acidaminococcus* sp. D21 presentan identidad con ADN polimerasas: El *orf10* de IG-ACI-2 (662 aa.) es una ADN polimerasa I, de la clase A (superfamilia que agrupa a las ADN polimerasas relacionadas con la ADN polimerasa I de *E. coli*). Su función principal es el relleno de las mellas en la doble cadena durante la recombinación, replicación o reparación del ADN. Posee las actividades polimerasa 5'-3' y exonucleasa 5'-3'. Este *orf* aparece duplicado en IG-ACI-2, dado que el *orf114* presenta una identidad a nivel aminoacídico del 85% con el *orf10*. Aparece también esta misma polimerasa en *Acidaminococcus* sp. D21 (*orf7*), con una sola copia.

En *Acidaminococcus* sp. D21 se identificó en el *orf11* una ADN polimerasa diferente, de 803 aa., sin identidad estadísticamente significativa con las anteriores. Se trata en este caso de una ADN polimerasa de origen fágico, en concreto una primasa de la familia P4. Este tipo de proteínas se encargan de formar el primosoma (junto a las helicasas), en el proceso de replicación del ADN. En IG-ACI-2 se corresponde con el *orf56* (762 aa.) y con el *orf110* (803 aa.), por lo que parece darse de nuevo un fenómeno de duplicación. El *orf56* de IG-ACI-2 tiene una identidad a nivel de aminoácido del 53% con los otros dos.

Destacar finalmente los *orf57-orf59* y *orf107* de IG-ACI-2, que podrían ser la subunidad δ -28 de una ARN polimerasa, de la subfamilia FliA/WhiG (de nuevo se observa duplicación, y la misma situación relativa con respecto a la primasa). En el elemento de *Acidaminococcus* sp. D21 corresponde con el *orf14*.

El *orf18* (71 aa.) de IG-ACI-1 es un regulador transcripcional de la familia XRE. El *orf44* (150 aa.) es la misma proteína, truncada. Este *orf18* pertenece a la familia elementos de respuesta a los xenobióticos, con un motivo Hélice-Giro-Hélice de unión al ADN.

IG-ACI-2 presenta una proteína que contiene un dominio de la proteína Mrr (28) del sistema de restricción. Se trata del dominio carboxilo terminal del *orf106* (350 aa.). Este *orf* corresponde con el *orf54* (350 aa.) del elemento de *Acidaminococcus* sp. D21.

Además, IG-ACI-2 contiene otras dos enzimas de restricción: la endonucleasa de restricción BglII (*orf17*, 218 aa.), cuya diana es (A_GATCT), y una endonucleasa con un dominio HNH (*orf52*, 159 aa.), relacionado con proteínas housekeeping, como por ejemplo MutS, colicinas bacterianas o anaredoxinas.

d) Genes cuyo origen es PBSX y otros genes de origen fágico. Ya se ha mencionado anteriormente el importante porcentaje de secuencia en el elemento portador de ACI-1 que procede del profago defectivo de *Bacillus subtilis* PBSX. PBSX es una *phibacina*, una bacteriocina con características de bacteriófago, de unas 19 Kb. de longitud. Sus propiedades biológicas resultan bastante particulares. En células lisogénicas expuestas a daño en su ADN, se producen partículas similares a bacteriófagos que se encargan de matar a otras células no lisogénicas uniéndose a su pared celular y distorsionando su estructura. Estas partículas presentan una cápside pequeña y una cola larga. La cápside parece contener hasta 13 Kb. de segmentos del cromosoma del hospedador, tomados al azar. Estos fragmentos nunca son inyectados en las células susceptibles. Así pues, PBSX

parece que no se propaga merced a estas partículas de tipo vírico, sino que parece ser una bacteriocina originada a partir de un bacteriófago (19, 23).

El gen *xre* (29), que codifica una proteína represora, controla la inducción de PBSX, y está presente en la estructura de IG-ACI-1. Se parece a los factores *cI* y *cro* del fago Lambda. Posee un dominio de unión al ADN tipo Hélice-Giro-Hélice. Corresponde con los *orf8* y en parte con *orf9* (truncada) en IG-ACI-1. En IG-ACI-2 se corresponde con *orf18* y *orf44*. En el elemento de *Acidaminococcus* sp. D21 no aparece ningún *orf* que se corresponda con el gen *xre*. Tampoco se encontró ninguna de las secuencias operadoras de la región promotora del gen *xre* (secuencia consenso: GATACAAAATGTATC).

Por otro lado, el factor σ (28) de la familia WhiG, ya mencionado, parece ser parte de la región de control de PBSX (*orf55* y *orf57* en IG-ACI-1; *orf53*, *orf57*, *orf107* en IG-ACI-2 y *orf16* en *Acidaminococcus* sp. D21), así como la terminasa, codificada en dos partes, un *orf* para la subunidad grande y otro *orf* para la subunidad pequeña (*orf64*, *orf65*, *orf66* en IG-ACI-1; *orf45*, *orf95*, *orf96* en IG-ACI-2; *orf27*, *orf26* en el elemento de *Acidaminococcus* sp. D21).

XkdG, XkdK y XkdM son *orf* de PBSX que se sabe están relacionados con la excreción de grandes fragmentos del cromosoma de *Bacillus subtilis*, llegando a ser éstos mayores de 50 Kb.

e) Genes relacionados con la regulación del ADN. Se localizaron una serie de *orfs* cuya secuencia se identifica con genes relacionados con la regulación del ADN. Comenzaremos por la diacilglicerol quinasa, que posee un dominio VRR-NUC (30, 31), asociado a endonucleasas de restricción de tipo III (las cuales catalizan el corte del ADN fuera de su secuencia diana, y requieren dos de estas secuencias en orientaciones opuestas en la misma molécula de ADN para poder llevar a cabo la catálisis).

Las diacilglicerol quinastas eliminan el diacilglicerol circulante convirtiéndolo en ácido fosfatídico, de modo que se piensa que atenúan las cascadas de señalización mediadas por diacilglicerol. Existen estudios en *E. coli* que relacionan la respuesta a estrés múltiple con la regulación de los genes de la síntesis de fosfolípidos (31). El *orf53* (125 aa.) de IG-ACI-1; el *orf55* (100 aa.) y el *orf109* (125 aa.) (identidad entre sí del 67% a nivel de aminoácidos) de IG-ACI-2; y el *orf12* (125 aa.) del elemento de *Acidaminococcus* sp. D21 corresponden con la diacilglicerol quinasa.

Otro gen de gran interés en este grupo es el de la N-acetil muramoil-L-alanina amidasa (EC 3.5.1.28), también conocida como aminohidrolasa del peptidoglicano. Corresponde con el *orf91* (185 aa.) y *orf116* (179 aa.) en IG-ACI-1 (las cuales no están relacionadas entre sí); *orf20* (184 aa.) y *orf69* (185 aa.) en IG-ACI-2 (identidad entre sí del 50% a nivel aminoacídico); *orf15* (185 aa.) en el elemento de *Acidaminococcus* sp. D21. Los tres *orf* de 185 aa. son el mismo gen. Esta enzima hidroliza el enlace entre el ácido N-Acilmurámico y los L-aminoácidos en ciertos glicopéptidos de la pared celular. Son peptidasas dependientes de Zn. Se trata pues de una de las diversas hidrolasas relacionadas con la degradación del peptidoglicano (PGHs) presentes en bacterias, bacteriófagos o profagos. En este caso, se trata de una endolisina, y no posee (al contrario que las autolisinas) péptido señal para ser traslocadas a la membrana citoplasmática, que se piensa se lleva a cabo merced a las holinas (sobre todo en el caso de enzimas codificadas en fagos). Como veremos más adelante, existe una holina con origen fágico en los tres elementos.

Pasaremos seguidamente a ocuparnos de la deoxirribosa fosfato aldolasa (EC 4.1.2.4). Esta enzima está relacionada con el catabolismo de los ribonucleósidos y los desoxirribonucleósidos. Cataliza la conversión de 2-Deoxi-D-ribosa 5-fosfato en D-gliceraldehído 3-fosfato y acetaldehído. Uno de los sistemas que resulta alterado (oxidado) en respuesta al estrés oxidativo en el patógeno oportunista anaerobio *Fusobacterium nucleatum* es el grupo de enzimas glicolíticos formado por la D-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la fructosa 6-fosfato aldolasa.

Los *orf* correspondientes son: en IG-ACI-1 el *orf58* (79 aa.), que es una proteína truncada, y el *orf98* (130 aa.); en IG-ACI-2 el *orf9* (135 aa.) y el *orf67* (130 aa.); en el elemento de *Acidaminococcus* sp. D21, el *orf13* (130 aa.).

Otro grupo es el de las ADN metilasas/metiltransferasas/metiladenina glicosilasa. La distribución en cada elemento es IG-ACI-1: *orf59* (411 aa.) (metilasa), *orf60* (525 aa.) (metiltransferasa), *orf95* (355 aa.) (metiltransferasa), *orf97* (219 aa.) (metiladenina glicosilasa).

IG-ACI-2: *orf16* (438 aa.) (ADN metiltransferasa específica de sitio), *orf50* (418 aa.) (metilasa), *orf94* (276 aa.) (dominio O-metiltransferasa), *orf102* (412 aa.) (ADN metilasa).

Elemento de *Acidaminococcus* sp. D21: *orf43* (276 aa.) (O-metiltransferasa), *orf50* (412 aa.) (metilasa).

f) Otros factores. Se repite en los tres elementos una terna de factores de virulencia. El primero de los tres factores se corresponde con una amidoligasa, el segundo es un factor sin determinar también relacionado con virulencia, y el tercero una proteína de la familia de ciclotransferasas AIG2, que en *Firmicutes* siempre aparece en el entorno genético de las amidoligasas. El nombre de AIG2 procede de “avrRpt2-induced gene”, un factor relacionado con virulencia en *Pseudomonas*. Esta familia también incluye proteínas relacionadas con resistencia al telurito (trgB), compuestos utilizados en la industria y como agentes antimicrobianos en el pasado.

Las ternas correspondientes las forman los genes: *orf61*, *orf62* y *orf63* (respectivamente) en IG-ACI-1; *orf98* (AIG2), *orf99*, *orf101* en IG-ACI-2; *orf22*, *orf23* y *orf24* en *Acidaminococcus* sp. D21.

En IG-ACI-1 aparecen otros dos factores relacionados con virulencia, *orf6* y *orf7*, y uno más en IG-ACI-2 (*orf49*), si bien no es posible precisar su naturaleza. Por último, destacar el *orf10* de IG-ACI-1, que es un antirrepresor de la transcripción en profagos, con los dominios KilAC y BRO (de baculovirus).

2.5 Búsqueda de IG-ACI-1 en las cepas de la colección RYC.

Una vez estuvo bien definido IG-ACI-1, se analizó la presencia de esta estructura en las cepas de la colección RYC. Se diseñó una serie de 46 PCR solapantes (2,5 Kb. de media), cuyos resultados permitieron analizar la presencia de IG-ACI-1 en cada una de las cepas.

Cepas → PCR ↓	RYCMR95	RYC-02	RYC-24	RYC-88	RYC-37	RYC-56	RYC-93	4276
1	+++	+	+	+	+	+	+++	++
2	+++	++	-	+	++	+	+++	++
3	++	-	-	-	+	-	++	-
4	+++	+	-	-	+	+	+	+
5	+++*	+++*	++*	+	+++*	+++*	+++*	+++*
6	+++	+++	++	+	+++	++	++	++
7	+++	+++	++	-	+++	-	+++	+++
8	+++	+++	-	-	+++	++	++	++
9	+++	++	++	++	+++	-	-	+++
10	+++	+++	+	-	+++*	+	+++	+
11	+++*	+++*	-	-	+++*	+++*	+++*	+++*
12	+++	+++	++	+	+++	+	++	++
13	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++
14	+++	-	-	-	+	++	++	+
15	+++	+++	++	-	++	+++	++	++*
16	+++	-	-	-	-	++	-	-
17	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++
18	+++	+	-	-	+	+	+	-
19	++	+	+	+	-	-	-	-
20	+++	+	++	+	++	+	-	++
21	+++	+++	-	-	++	+++	+++	+++
22	+++	+++	-	-	+++	+++*	++	+++
23	+++	++*	+	+	+++*	+	+	+
24	+++	+	-	-	+++	+	+	-
25	+++	+	-	-	+	++	++	++
26	+++	+	+++*	+	+	+	+	++*
27	+++	+	-	-	+	-	+++	-
28	+++	+	-	-	+	+	+++*	+
29	+++	+	-	-	++	+	+++	+++
30	+++	+++	+++	-	+++	++	+++	++
31	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++
32	+++	+++	+	-	+	+	+++	+
33	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
34	+++	-	-	-	-	++	+++	+++
35	+++	+++	+	-	+++	+++	+++	+++
36	+++	++	-	+	+++	+++	+++	+++
37	+++	+++	+	+++	+++*	+++	+++	+++
38	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++
39	+++	+++	+	-	+++	+++	+++	+++
40	+++	+++	+++	+++*	+++	+++	+++	+++
41	+++	++	-	-	++	++	+++	+
42	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	++
43	+++	++	+	-	++	++	+++	+++
44	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
45	+++	-	+	-	+++	+++	+++	+++
46	+++	+	+	+	+++*	+++	+++	+++

Tabla 6.- Resultados de las PCR solapantes que permiten analizar la presencia de IG-ACI-1 en la colección RYC y la cepa 4276 de la colección HAV (poseedora de la β -lactamasa *bla_{aci1}*). Todas las PCRs se efectuaron por duplicado. (*) PCR repetida 3 veces. El número de + indica la intensidad de la banda obtenida en la lectura del gel de agarosa.

El resultado de este estudio aparece esquematizado gráficamente en las figuras 17 y 18. Obsérvese la ausencia del gen *bla_{aci1}* en las cepas sensibles a antibióticos β -lactámicos.

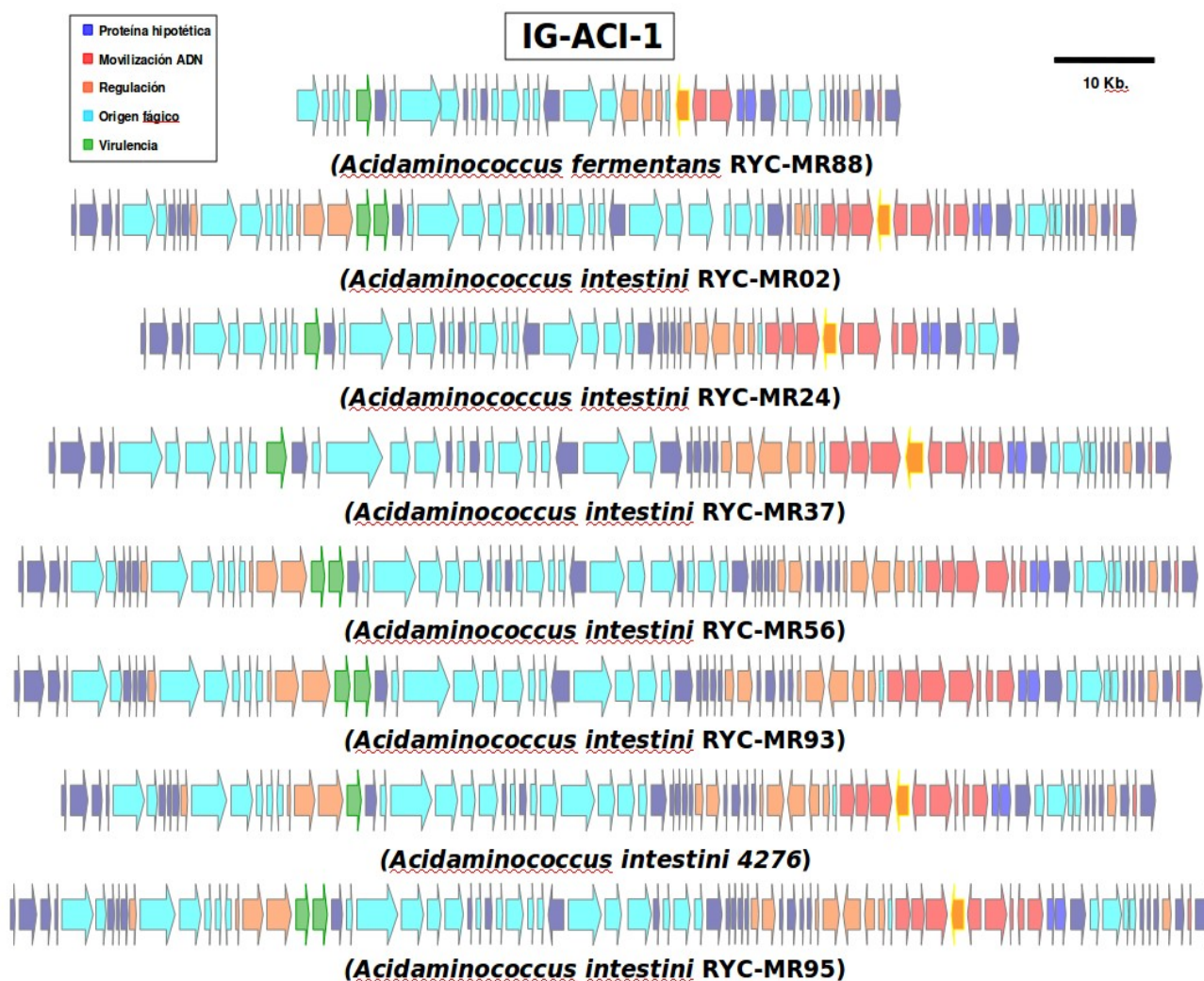


Figura 17.- Reconstrucción de los elementos tipo IG-ACI-1 en cada una de las cepas de la colección RYC y en la cepa 4276 de la colección HAV. Se llevó a cabo merced a 46 PCRs solapantes diseñadas tomando como base el elemento completo IG-ACI-1 en *A. intestini* RYC-MR95.

Este esquema actualiza los presentados en las figuras 6 y 7, que se correspondían con un esbozo previo realizado en base a 30 PCRs solapantes cuyo alcance se limitaba a las 60Kb. centrales, a diferencia de estas 46 PCRs que abarcan todo el elemento correctamente definido.

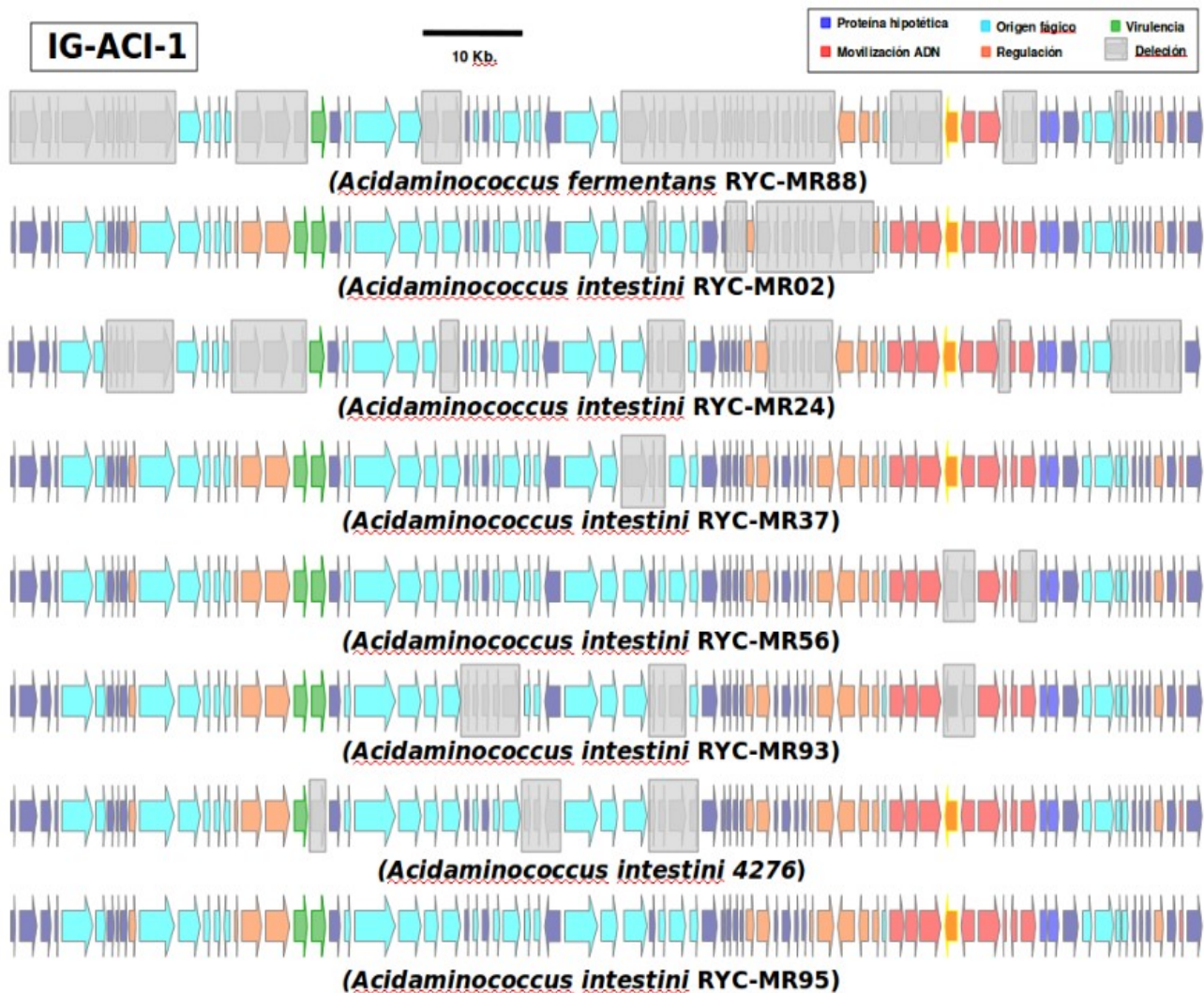


Figura 18.- Reconstrucción de los elementos tipo IG-ACI-1 en cada una de las cepas de la colección RYC y en la cepa 4276 de la colección HAV. Se llevó a cabo merced a 46 PCRs solapantes diseñadas tomando como base el elemento completo IG-ACI-1 en *A. intestini* RYC-MR95. Las cajas de color gris señalan los *orfs* ausentes en cada elemento con respecto a IG-ACI-1. No se detectaron fragmentos en las cepas estudiadas no presentes en la cepa modelo RYC-MR-95.

2.6 Movilización de IG-ACI-1: inferencia mediante estudios de filogenia.

El hallazgo del gen *bla_{aci1}* en *Phascolarctobacterium* junto a lo que podemos considerar el módulo central del elemento IG-ACI-1, nos lleva a profundizar en el análisis del origen de este elemento.

Tal y como ya se ha señalado en la sección 2.2, es factible plantear dos hipótesis: en un primer escenario, el elemento se habría incorporado en un momento posterior a la separación de las dos especies (*A. intestini* y *A. fermentans*). En este escenario, todos los casos posibles implican la movilización del elemento, bien de una especie a otra, bien desde una tercera especie ajena donadora hacia ambas especies de *Acidaminococcus*. El elemento aparece en el genoma de *Acidaminococcus* como consecuencia de un evento de transferencia génica horizontal en un momento próximo en la evolución.

En el segundo escenario, IG-ACI-1 se introduce en un momento anterior en la evolución, surgiendo en un hipotético ancestro común a la línea de la que surge *Acidaminococcus*, de modo que IG-ACI-1 se habría incorporado al cromosoma de *Acidaminococcus* antes de la separación de las dos especies. IG-ACI-1 sería algo ancestral que ya estaría previamente en el cromosoma, y que posteriormente se perdería por delección en algunas de las cepas en ambas especies.

Los siguientes estudios pretenden aclarar esta disyuntiva. Para poder discernir en qué escenario nos encontramos, se realizó un estudio preliminar en el que se realizó un árbol de filogenia utilizando secuencias que sabemos son cromosómicas, procedentes del ancestro de ambas especies, en concreto el gen *gctA*, de la subunidad A de la glutaconil CoA transferasa, una enzima fundamental en el metabolismo de esta especie (árbol no mostrado), y por otro lado se utilizaron las secuencias del 16S RNAr (Apéndice C, Figura C1). En ambos casos podemos separar claramente en dos grupos bien definidos ambas especies de *Acidaminococcus*.

Seguidamente se analizaron (figura 19) las secuencias de dos *orf* presentes en IG-ACI-1, en concreto *dra1* (del sistema de dobles recombinasas) y el gen que codifica XkdT, procedente del fago PBSX de *Bacillus subtilis*. Puede observarse que, en ambos casos, estas secuencias nos separan en dos grupos nuestras cepas, pero en ambos grupos tenemos tanto *A. fermentans* como *A. intestini*, es decir, comparando las secuencias del elemento en cada cepa parece que no encontramos diferencia entre ambas especies.

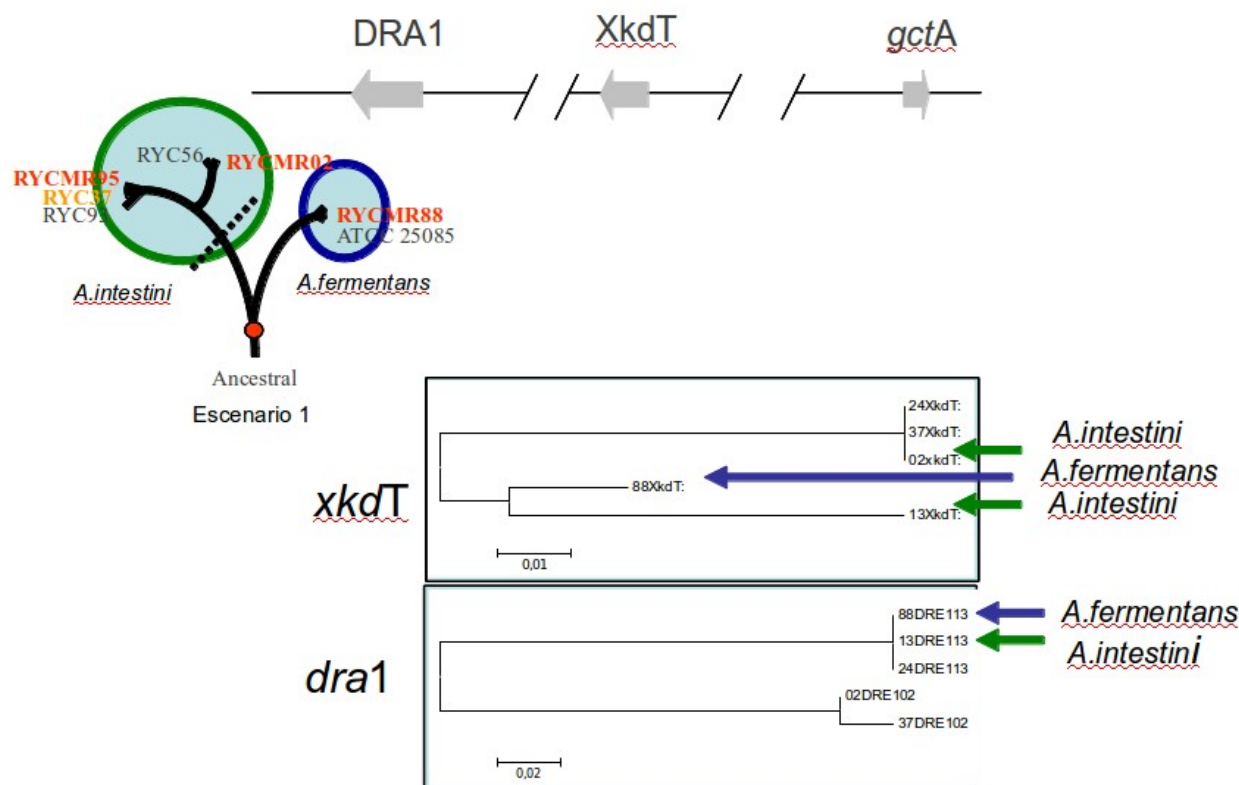


Figura 19.- Árboles filogenéticos (elaborados mediante NJ) utilizando las secuencias de los genes *xkdT* y *dra1* (presentes en el elemento IG-ACI-1) obtenidas de las cepas de la colección RYC.

A continuación, se repitió el mismo tipo de estudio, esta vez tomando un mayor número de secuencias en el análisis. Se elaboró un árbol filogenético más amplio basado en el 16S ARNr, abarcando las especies filogenéticamente cercanas a *Acidaminococcus*. Dicho árbol está representado en la figura 20. Podemos utilizarlo para situar a la especie en su contexto taxonómico y evolutivo. Puede apreciarse la situación de *Phascolarctobacterium* con respecto a *Acidaminococcus*. Recuérdese que en este género se ha podido localizar (como se ha mostrado anteriormente) el gen *bla_{aci1}*.

Del mismo modo, se elaboró un árbol de filogenia tomando las secuencias de todas las recombinasas presentes en estas especies, incluyendo las presentes en IG-ACI-1, IG-ACI-2 y el elemento homólogo en *Acidaminococcus* sp. D21. Dicho árbol aparece representado en la figura 21.

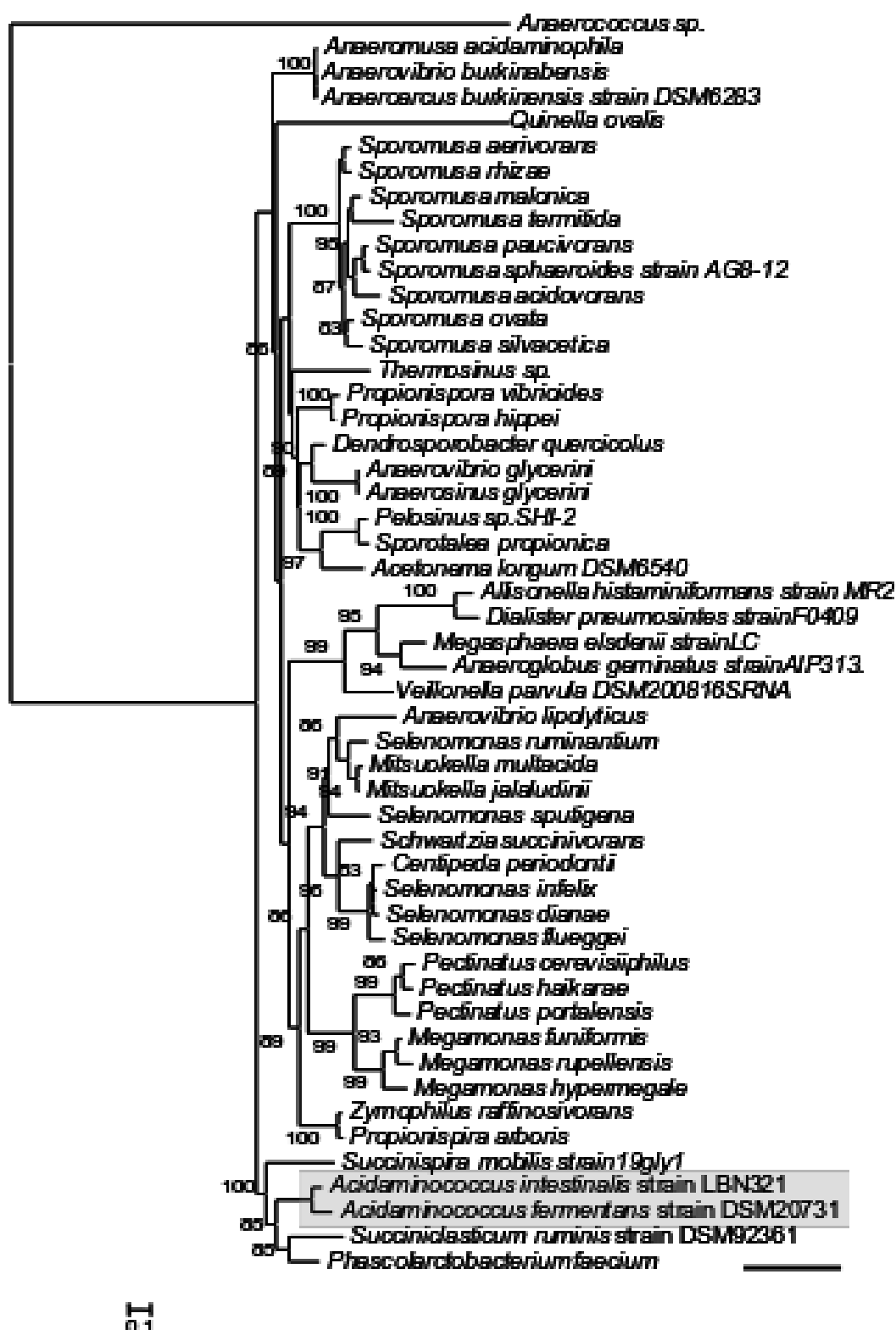
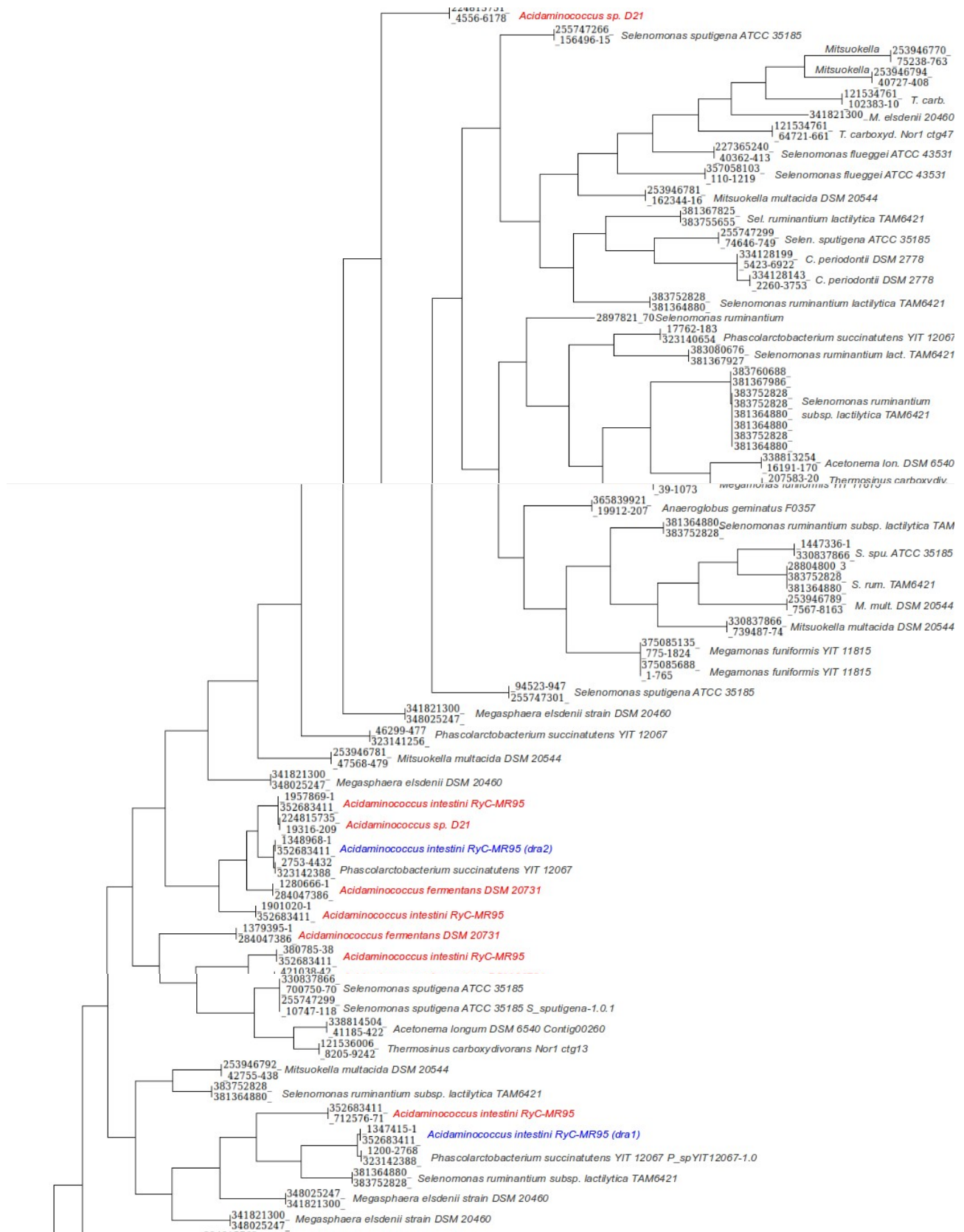


Figura 20.- Árbol (NJ) de 16S ARNr de especies filogenéticamente más próximas a *Acidaminococcus*. La flecha indica la especie bacteriana en la que se ha encontrado el gen *bla_{acil}* como el descrito en *Acidaminococcus*.





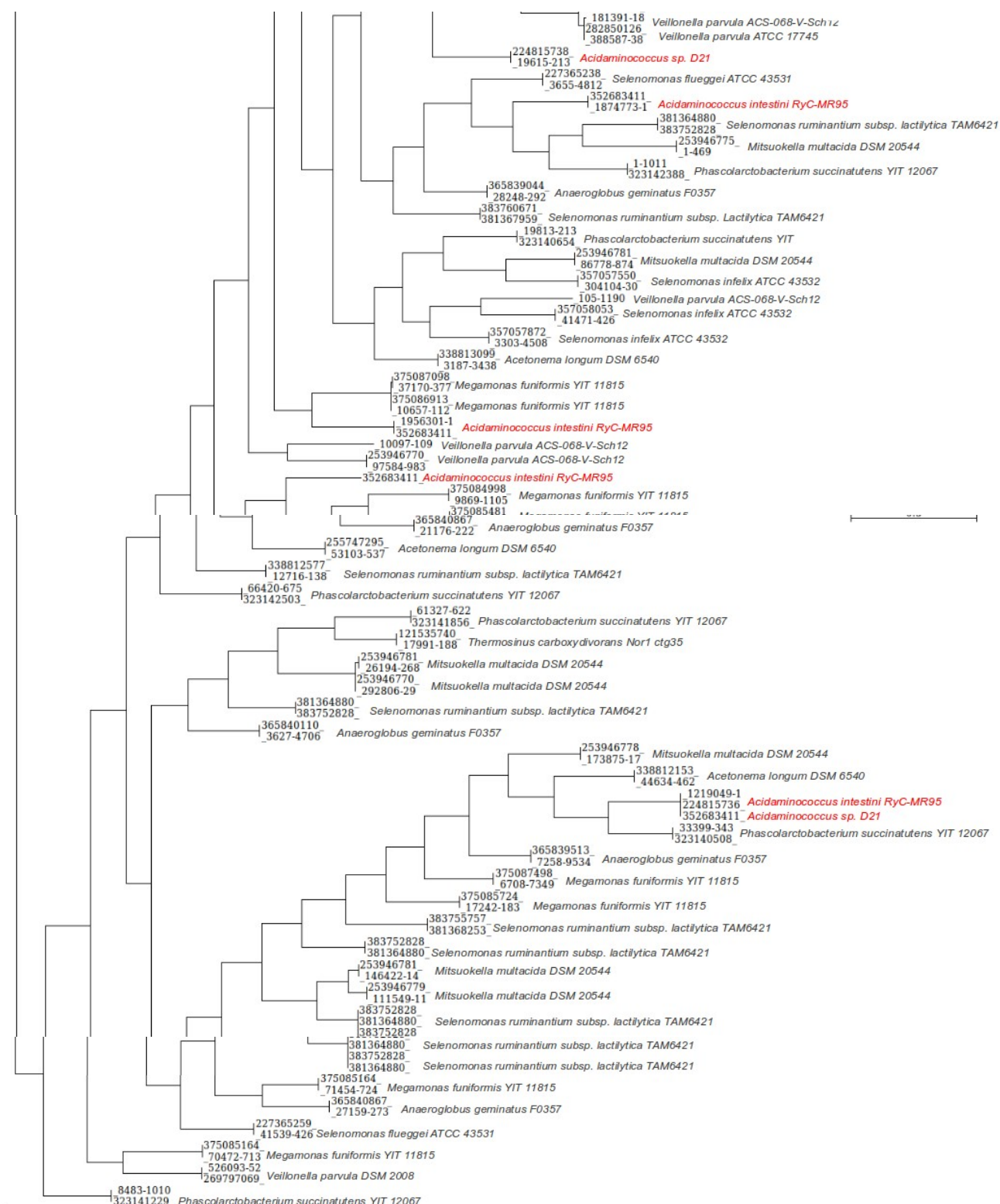


Figura 21.- Árbol (NJ) elaborado utilizando las secuencias de todas las recombinasas presentes en el *clúster* de *Acidaminococcus*. Se aprecia la discordancia con el árbol basado en el ARN 16S (figura 20). En rojo aparecen señaladas las recombinasas del género *Acidaminococcus*, y en azul se especifica la posición de Dra1 y Dra2, del elemento IG-ACI-1.

El árbol de la figura 21 está elaborado recogiendo la secuencia de ADN común de diferentes grupos de recombinasas dentro de las especies pertenecientes al *clúster* de *Acidaminococcus*. Si se compara con el árbol elaborado a partir del 16S RNA, observamos que tanto entre grupos como dentro de una misma rama, aparecen tanto secuencias pertenecientes a las especies del género *Acidaminococcus* relacionadas, como junto a otras especies con las que no tiene relación evolutiva directa. Esta observación apunta la conveniencia de descartar el primer escenario, la entrada del elemento en un momento ancestral, de modo que su origen fuese cromosómico. No podemos saber en este punto qué sucesos de movilización han ocurrido, si procede de un tercero hacia ambas especies o bien desde una de ellas que lo adquirió pasó a la otra, pero si podemos apuntar a que, muy posiblemente existe movilización del elemento, con las consecuencias que esto podría implicar a nivel de diseminación de resistencias.

Por último, apuntar que los experimentos de irradiación con luz UV con objeto de provocar la movilización del elemento resultaron, tras el ensayo de varios cientos de placas, en todo momento negativos, por lo que se concluyó abandonar este abordaje. Es preciso continuar en el futuro con otros intentos con objeto de probar objetivamente la capacidad de movilización actual de IG-ACI-1.

3. Entorno genético del gen *tet*(32).

Se identificó el gen no mosaico *tet*(32) (1920 pb., codificando para una proteína de 639 aminoácidos; contenido G+C del 41,1%) en ocho cepas independientes de *Acidaminococcus intestini* resistentes a tetraciclina (RYC-MR95, RYC4356, RYC-MR88, RYC4093, B2093, B2316, B5309 y LBN321). Las secuencias de todos los genes *tet*(32) encontrados resultaron idénticas, de modo que todos los estudios comparativos se llevaron a cabo tomando nuevamente RYC-MR95 como modelo. La proteína codificada por el gen *tet*(32) de la cepa RYC-MR95 tiene una identidad media a nivel de aminoácido del 98,9% con el resto de secuencias previamente publicadas, y menos del 80% de identidad a nivel de aminoácido con el resto de proteínas codificadas por los genes *tet*.

	RYC-MR24	RYC-037	RYC-056	RYC-MR95	RYC-093
<i>tet</i> (W)	--	+	--	--	+
<i>tet</i> (32)	--	-	+	++	+
CMI (mg/ml)	4	128	64	128	64

Tabla 7-. Detección de los genes *tet* encontrados en *A. intestini*. El signo ++ refleja que existen 2 copias del gen. (*) Es un gen mosaico *tet*(W/32/W). La fila inferior muestra los valores de CMI (µg/ml) a tetraciclina.

3.1 Elemento genético portador de *tet*(32).

Tomando como origen la propia secuencia del gen *tet*(32), identificado en la cepa RYC-MR95 durante el estudio de sensibilidad a los antibióticos, se secuenció un total de 14,3 Kb mediante PCR inversa. Se pretendía caracterizar el elemento genético portador del gen *tet*(32). La escasa información sobre el entorno de los genes *tet*(32), limitada a lo publicado en cepas de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis* o *Eubacterium saburreum* (32), apenas aportaban alguna información del entorno génico, pero sí sirvieron, como veremos más adelante, para corroborar la existencia de un origen común entre la secuencia encontrada en *A. intestini* y las secuencias publicadas hasta el momento. Así, la secuencia completa alrededor de *tet*(32) en *A. intestini*, podría servir para definir el entorno en las cepas ya descritas.

Tomando las 14,3 Kb secuenciadas en *A. intestini* RYC-MR95, se pretendía conocer si en ese fragmento inicial se encontraba el hipotético elemento móvil completo o, por el contrario, era necesario continuar con la secuenciación. Para resolver esta cuestión, y definir adecuadamente los extremos del elemento, se analizaron las secuencias depositadas en las bases de datos de genomas completos y actualmente en fase de anotación mediante el programa Blastx, cruzando estos datos con las 14,3 Kb conocidas.

La comparación con las secuencias de *Clostridium scindens* y *Anaerotruncus colihominis* disponibles (Genome Refseq: NZ_ABFY000000000, y NZ_ABGD000000000, respectivamente) proporcionaron la pista para definir una región altamente conservada, común en las tres cepas. Mostraron una identidad >90% a lo largo de 11,6 Kb (que incluía por supuesto el gen de resistencia *tet*(32)). La secuencia en las regiones flanqueantes a este fragmento de 11,6 Kb divergen abruptamente en las tres especies, sugiriendo un proceso de transferencia horizontal reciente entre esas especies y apoyando fuertemente la posibilidad de ser esas 11,6 Kb. la secuencia completa que defina el elemento móvil que porta *tet*(32).

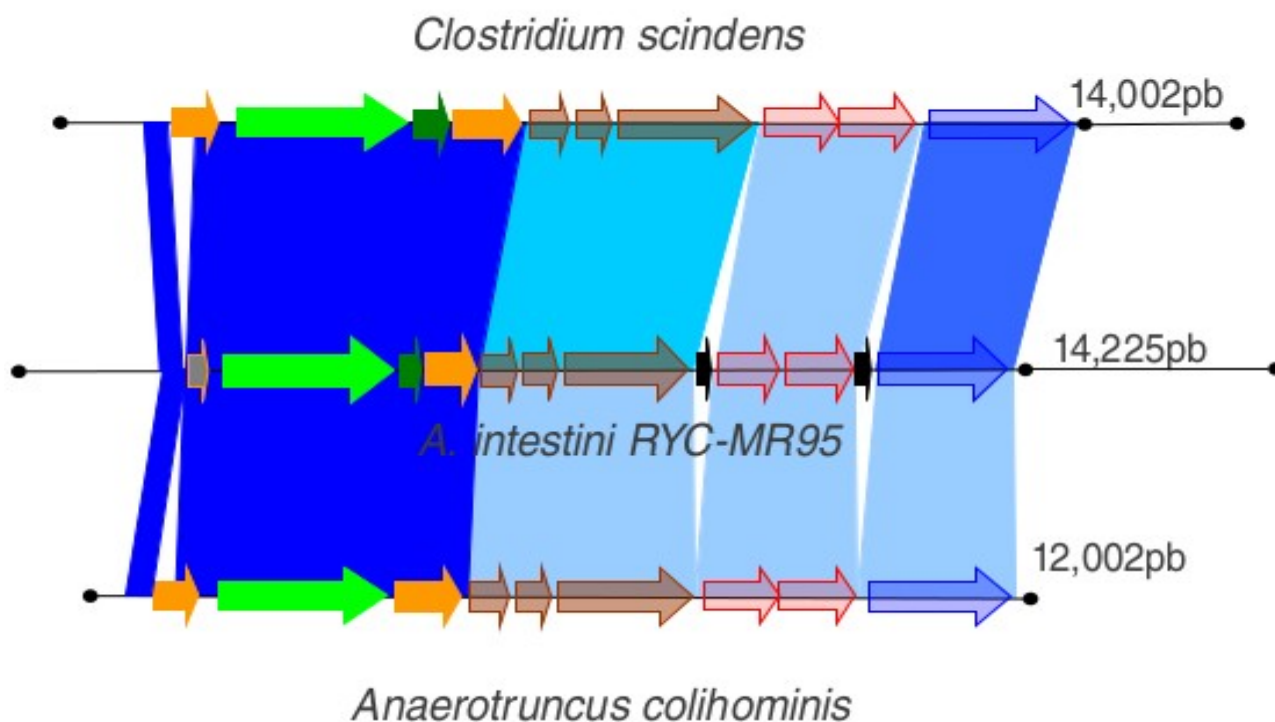


Figura 22.- Comparación a nivel de nucleótidos entre *Clostridium scindens*, *Anaerotruncus colihominis* y *Acidaminococcus intestini* RYC-MR95. Las intensidades de color representan el porcentaje de homología (el azul más oscuro representa una homología de >90%, y el azul más claro una homología del 80%). Números de acceso en Genbank son ABFY02000002 y ABGD02000007.

3.2 Análisis de los diferentes *orf* del elemento portador de *tet*(32). Resultados de la anotación.

Una vez definida la secuencia del elemento que portaba el gen *tet*(32) en *A. intestini* RYC-MR95, se realizó un análisis detallado de los diferentes *orfs* encontrados a lo largo de este fragmento de 11,6 Kb. Así, se pudieron diferenciar cuatro grandes módulos: regulación transcripcional, movilización-conjugación, replicación, recombinación.

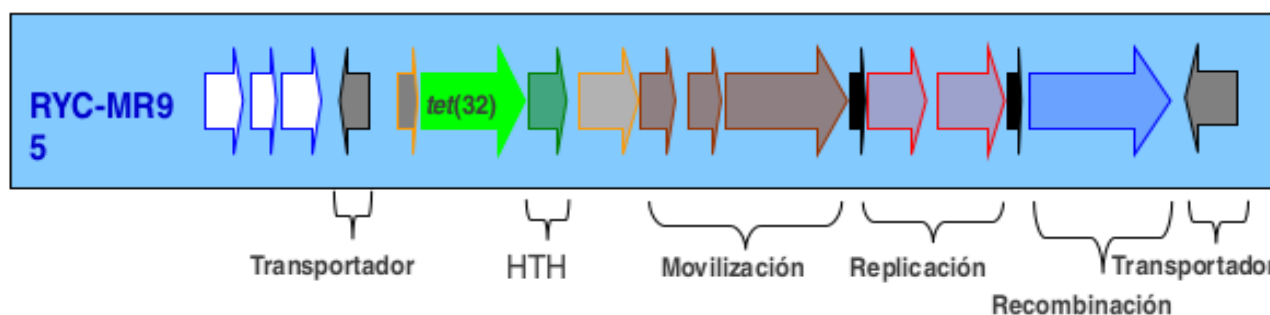


Figura 23.- Entorno del gen *tet*(32) en *A. intestini* RYC-MR95. Varios *orf* aguas abajo de *tet*(32) están muy relacionados con transferencia génica horizontal. Pueden distinguirse 3 módulos: 1) Movilización (relaxasa y una proteína relacionada con Tn916), 2) Replicación y 3) Recombinación e integración (una serina-recombinasa grande relacionada con TndX). En los extremos hay dos *orf* muy relacionados con proteínas de transporte. El Transportador-1 es una proteína truncada.

a) Módulo de los reguladores transcripcionales (HTH): Es bien conocido que la expresión de los genes *tet* es dosis-dependiente (33). En el elemento definido aparecen tres reguladores transcripcionales que unen ADN por vía del motivo hélice-giro-hélice (HTH).

El primero de estos reguladores, 104 aminoácidos, está 2457 pb. aguas arriba del gen *tet*(32). Pertenece a la familia HTH-5 (subfamilia ArsR, represor del operón de resistencia a arsénico y represores homodiméricos regulados por metales), a la que también pertenece MarR.

El segundo regulador es una proteína de 114 aminoácidos, también represor, localizado a tan solo 148 pb. “corriente abajo” del gen *tet*(32). Pertenece a la familia de HTH-3 (similares a la familia Xre) de reguladores transcripcionales de la familia del elemento de respuesta a xenobióticos, a la que también pertenece como modelo LacI.

Finalmente, a 1722 pb. “corriente abajo” del gen *tet*(32), existe un tercer regulador transcripcional de la familia sigma 70_r4, de 148 aminoácidos. Podría estar relacionado con la secuencia -35 de reconocimiento del promotor de la RNA polimerasa, y posiblemente esté relacionado con transposones conjugativos.

b) Módulo de conjugación/ movilización. Existen dos *orfs* que codifican para dos hipotéticas proteínas relacionadas con procesos de movilización: MobC y una relaxasa.

El primero, codifica para una proteína putativa de 145 aminoácidos similar (75% de identidad a nivel de aminoácidos) a una proteína hipotética de movilización de *Roseburia* sp. cepa A2-183 (GenBank: AJ421625.2), relacionada con Tn916 [tet(M)].

El segundo *orf* codifica para una proteína hipotética de 544 aminoácidos con homología con relaxasas del phylum *Firmicutes* (relacionada con transposones conjugativos). Es la proteína que inicia y termina la conjugación haciendo una mella en el ADN (oriT).

c) Módulo de replicación. Se describen otras 2 proteínas a 368 pb. de la relaxasa anteriormente descrita: El primer *orf* tiene un tamaño de 759 pb., codificando una proteína hipotética conservada de 253 aminoácidos, similar a DnaD (phage_rep_org_N; organizador N-terminal del replisoma de fago), una proteína de origen fágico relacionada con el inicio de la replicación en *Streptococcus pyogenes*.

El segundo *orf* se solapa 4 pb. con el anterior *orf*, sugiriendo fuertemente que ambos genes se transcriben conjuntamente. Este segundo *orf* muestra homología con proteínas relacionadas con replicación tipo DnaC (portando el dominio P-loop NTPasa), posiblemente relacionada con las helicasas del fago Spy1680 de *Streptococcus pyogenes*. Así pues, este módulo consistiría en un sistema de dos componentes, DnaD-DnaC, transcritos posiblemente de manera conjunta desde un mismo promotor.

d) Módulo de recombinación. Se trata de un único *orf* que codifica para una hipotética proteína de 540 aminoácidos, con alta homología con serin-recombinasas de gran tamaño, tipo TnpX o TndX, descritas en *Clostridium perfringens* y *C. difficile* (34, 35).

Estas recombinasas sitio-específicas han sido únicamente descritas en bacterias Gram-positivas, aunque en muchas ocasiones relacionadas con determinantes de resistencia antibiótica, como la resistencia a β -lactámicos en *S. aureus* o la resistencia a macrólidos en *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, en todos estos casos aparecen dos serin-recombinasas en tándem que siguieron procesos de duplicación génica, como ya se ha comentado en la primera parte de los resultados.

En este caso solo se detecta una única recombinasa sitio-específica. Igualmente, presenta un 78% de identidad a nivel nucleotídico (80% de identidad a nivel de aminoácido) con el gen *tnp* (que codifica para una transposasa) del elemento ATE-2 de *Arcanobacterium pyogenes* OX4 (36), y un 89% de identidad a nivel de nucleótido (93% de identidad a nivel aminoácido) con el *orf2* del entorno genético del gen *tet*(40) en el denominado clon 3 de una bacteria no cultivada (GenBank: FJ158002.1).

e) Otros orfs. Existe un *orf* entre los dos relacionados con regulación, HTH-3 (familia Xre) y el hipotético sigma70_r4. Se trata de un *orf* de 768 pb que codifica para una hipotética proteína con homología con metiltransferasas de la familia de metiltransferasas dependientes de SAM en *Bifidobacterium thermophilum* (GenBank: ACA23190.1).

Existe otro *orf* relacionado con transferasas. Se trata de un *orf* de 243 pb. que codifica para una proteína hipotética de 80 aminoácidos que presenta un 97% de identidad a nivel nucleotídico (95% de identidad a nivel aminoácido) con una fosfotransferasa putativa de *Streptococcus parasanguinis* y *Escherichia coli*, (dos de las especies en las que se ha descrito *tet*(32)). La secuencia tiene homología desde el nucleótido 21 hasta el 243 con el fragmento que va del nucleótido 300 al 522 (final de la secuencia) en el gen de la fosfotransferasa de *Streptococcus parasanguinis*. Así pues, el producto génico podría ser una fosfotransferasa truncada.

f) Entornos flanqueantes del elemento. La amplificación mediante PCR convencional, utilizando cebadores diseñados en las sucesivas regiones flanqueantes en 5' y 3' del elemento que se iba alcanzando a medida que secuenciábamos mediante PCR inversa, amplificó, en un momento dado, un fragmento de aprox. 2,7 Kb en las cepas sensibles a tetraciclina. Este resultado significa que alcanzamos la región fuera de los extremos del elemento. Para definir de forma más precisa los límites del mismo, secuenciamos este fragmento.

Uno de los *orf* en esta secuencia, de 1125 pb., codificaba para una proteína hipotética de 374 aminoácidos con homología (88%) con una hipotética proteína de la superfamilia mayor de facilitadores transportadores (major facilitator superfamily transporter (37)), quizá relacionada con la resistencia a quinolonas. Ambas secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del elemento en las cepas resistentes resultaron dar idéntica homología con el *orf* localizado en las cepas sensibles.

La comparación de estas secuencias permitió definir con precisión los extremos del elemento. Si se toma la secuencia completa del elemento, más el entorno del mismo en las cepas resistentes, y cortamos la secuencia correspondiente al elemento, una vez definida, uniendo las secuencias flanqueantes en una nueva secuencia irreal, y buscamos en la base de datos, obtenemos la reconstrucción del mismo *orf* correspondiente al transportador encontrado en las cepas sensibles.

3.3 El elemento portador de *tet*(32) en las diferentes cepas del estudio y comparación con otras cepas no portadoras en la base de datos.

En el resto de las cepas en las que se amplificó el gen *tet*(32) (RYC-56, RYC-88, RYC-93, 2093, 2316, 5309, y 321), identificamos el mismo elemento genético ya definido. Mediante PCR solapante se amplificó el elemento completo según lo esperado, si bien este no fue secuenciado (datos no mostrados).

Dentro del elemento genético portador de *tet*(32), existen tres regiones que tienen homología con la secuencia de transposones ya conocidos: Una región de 1246 pb., que corresponde en el elemento genético a una región que va desde el punto de inserción en 5' hasta el nucleótido 395 dentro del gen *tet*(32), incluyendo el *orf* de la fosfotransferasa, tiene un 86% de identidad a nivel de nucleótidos con el transposón de *Butyrivibrio fibrisolvens* TnB1230 (38).

Otra región de 680 pb., desde el nucleótido 572 hasta el 1252 del elemento genético, que se corresponde con la región inmediatamente aguas abajo del *orf* de la fosfotransferasa hasta el nucleótido número 401 del gen *tet*(32), tiene un 75% de identidad a nivel de nucleótido con el transposón Tn5253 de *Streptococcus pneumoniae* (39).

Una tercera región, la mayor de ellas, de 2132 pb., desde el nucleótido 572 del elemento genético hasta el 2704, lo que se corresponde aproximadamente con el gen *tet*(32) y la región

inmediatamente aguas arriba del mismo. Esta región tiene un 72% de identidad a nivel nucleotídico con Tn916 de *Clostridium difficile*, si bien casi en su totalidad se corresponde con la homología entre los genes de resistencia a tetraciclina.

La comparación con otras secuencias portadoras de tet(32) arrojó una identidad a nivel de nucleótido de >90% con las secuencias cortas flanqueantes de *Eubacterium saburreum* 41.2T.2, *Streptococcus salivarius* FStet12, *Escherichia coli* ES2-K21 y *Streptococcus parasanguinis* 41.1T.

Como ya se ha apuntado anteriormente, cuando comparamos la secuencia del elemento genético completo con los genomas secuenciados o en proceso de secuenciación y las bases de datos nucleotídicas, encontramos alta homología con *Clostridium scindens* y *Anaerotruncus colihominis*, los cuales presentan un elemento de secuencia muy parecida, pero que no habían sido identificados. La mayor homología de estos elementos con el de *A. intestini* corresponde con los primeros 4.6 Kb., hasta el extremo 5' de la metiltransferasa SAM.

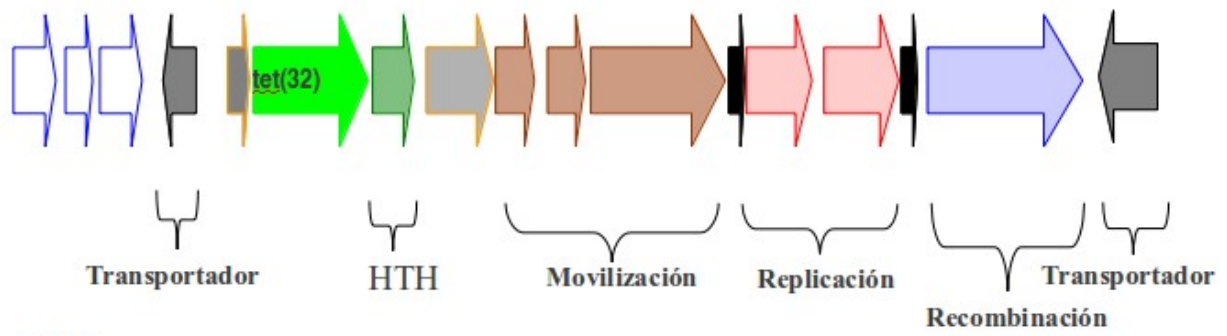
3.4. Experimentos de conjugación con *Streptococcus*. Movilización.

El protocolo expuesto por Ready y colaboradores fue puesto en práctica con objeto de lograr la movilización y transmisión del transposón conjugativo descrito.

Acidaminococcus intestini RYC-MR95 se utilizó como bacteria donadora, y como receptoras se emplearon las cepas *Streptococcus salivarius* CECT 805 y *Streptococcus oralis* CECT 907. La conjugación se llevó a cabo en anaerobiosis. Posteriormente se llevó el cultivo mixto a aerobiosis (primer factor selectivo), en un medio rico al que se añade tetraciclina, como segundo factor selectivo. De esta manera se seleccionarán los *Streptococcus* que hayan adquirido la resistencia a tetraciclina.

Estos experimentos arrojaron un resultado negativo, no consiguiéndose la conjugación del transposón portador de tet(32).

Elemento de *A. intestini* RYC-MR95



Tn916

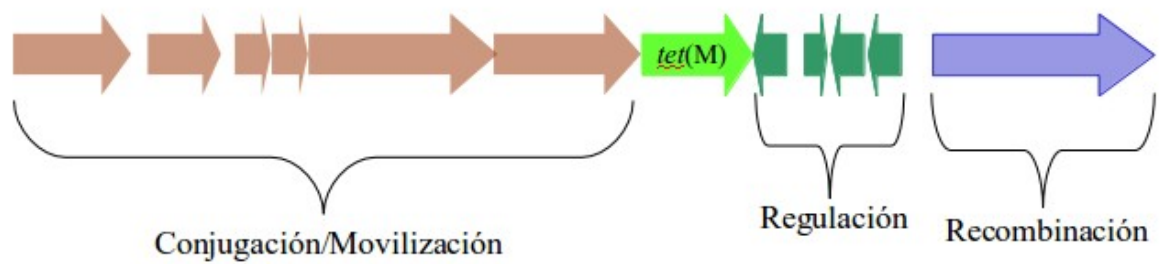


Figura 24.- Comparación del elemento genético portador del gen *tet(32)* en *A. intestini* RYC-MR95 con el transposón conjugativo Tn916.

4. Referencias.

- 1.- Livermore DM. *Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens*. 2012. Korean J Intern Med. 27(2):128-42.
- 2.- Laupland KB, Church DL, Vidakovich J, Mucenski M, Pitout JD. *Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli: importance of international travel*. 2008. J Infect. 57(6):441-8.
- 3.- Bush K, Jacoby GA. *Updated functional classification of beta-lactamases*. 2010. Antimicrob Agents Chemother. 54(3):969-76.
- 4.- Galán JC, Reig M, Navas A, Baquero F, Blázquez J. *ACI-I from Acidaminococcus fermentans: characterization of the first beta-lactamase in Anaerobic cocci*. 2000. Antimicrob Agents Chemother. 44(11):3144-9.
- 5.- Barlow M, Reik RA, Jacobs SD, Medina M, Meyer MP, McGowan JE Jr, Tenover FC. *High rate of mobilization for blaCTX-Ms*. 2008. Emerg Infect Dis. 14(3):423-8.
- 6.- Ito T, Hiramatsu K. *Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. 1998. Yonsei Med J. 39(6):526-33.
- 7.- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. *The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. 2001. Trends Microbiol. 9(10):486-93.
- 8.- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. *A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. 2000. Antimicrob Agents Chemother. 44(6):1549-55.
- 9.- Schwartz E, Kröger M, Rak B. *IS150: distribution, nucleotide sequence and phylogenetic relationships of a new E. coli insertion element*. 1988. Nucleic Acids Res. 16(14B):6789-802.
- 10.- Okinaka RT, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster AR, Hill KK, Keim P, Koehler TM, Lamke G, Kumano S, Mahillon J, Manter D, Martinez Y, Ricke D, Svensson R, Jackson PJ. *Sequence and organization of pXO1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes*. 1999. J Bacteriol. 181(20):6509-15.
- 11.- Del Grosso M, Camilli R, Iannelli F, Pozzi G, Pantosti A. *The mef(E)-carrying genetic element (mega) of Streptococcus pneumoniae: insertion sites and association with other genetic elements*. 2006. Antimicrob Agents Chemother. 50(10):3361-6.
- 12.- Pozzi G, Iannelli F, Oggioni MR, Santagati M, Stefani S. *Genetic elements carrying macrolide efflux genes in streptococci*. 2004. Curr Drug Targets Infect Disord. 4(3):203-6.

- 13.- Garza-González E, Morfín-Otero R, Llaca-Díaz JM, Rodríguez-Noriega E. *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting.* 2010. *Epidemiol Infect.* 138(5):645-54.
- 14.- Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* 2007. *Clin Microbiol Infect.* 13(3):222-35.
- 15.- Chancey ST, Zhou X, Zähler D, Stephens DS. *Induction of efflux-mediated macrolide resistance in Streptococcus pneumoniae.* 2011. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(7):3413-22.
- 16.- Xu X, Cai L, Xiao M, Kong F, Oftadeh S, Zhou F, Gilbert GL. *Distribution of serotypes, genotypes, and resistance determinants among macrolide-resistant Streptococcus pneumoniae isolates.* 2010. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3):1152-9.
- 17.- Brenciani A, Bacciaglia A, Vignaroli C, Pugnaroni A, Varaldo PE, Giovanetti E. *Phim46.1, the main Streptococcus pyogenes element carrying mef(A) and tet(O) genes.* 2010. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(1):221-9.
- 18.- Wood HE, Dawson MT, Devine KM, McConnell DJ. *Characterization of PBSX, a defective prophage of Bacillus subtilis.* *J Bacteriol.* 1990. May;172(5):2667-74.
- 19.- Lucchini S, Desiere F, Brüssow H. *Comparative genomics of Streptococcus thermophilus phage species supports a modular evolution theory.* 1999. *J Virol.* 73(10):8647-56.
- 20.- Chang YJ, Pukall R, Saunders E, Lapidus A, Copeland A, Nolan M, Glavina Del Rio T, Lucas S, Chen F, Tice H, Cheng JF, Han C, Detter JC, Bruce D, Goodwin L, Pitluck S, Mikhailova N, Liolios K, Pati A, Ivanova N, Mavromatis K, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Jeffries CD, Brettin T, Rohde M, Göker M, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Klenk HP. *Complete genome sequence of Acidaminococcus fermentans type strain (VR4).* 2010. *Stand Genomic Sci.* 29;3(1):1-14.
- 21.- Watanabe Y, Nagai F, Morotomi M. *Characterization of Phascolarctobacterium succinatutens sp. nov., an asaccharolytic, succinate-utilizing bacterium isolated from human feces.* 2012. *Appl Environ Microbiol.* 78(2):511-8.
- 22.- Número de acceso: NZ_ACGB00000000.
- 23.- McDonnell GE, Wood H, Devine KM, McConnell DJ. *Genetic Control of Bacterial Suicide: Regulation of the Induction of PBSX in Bacillus subtilis.* 1994. *J Bacteriol.* 176(18):5820-30.
- 24.- Lillehaug D, Lindqvist B, Birkeland NK. *Characterization of phiLC3, a Lactococcus lactis subsp. cremoris temperature bacteriophage with cohesive single-stranded DNA ends.* 1991. *Appl Environ Microbiol.* 57(11):3206-11.
- 25.- Hallet B, Arciszewska LK, Sherratt DJ. *Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinases XerC and*

- XerD: an enzymatic switch in site-specific recombination*. 1999. *Mol Cell*. 4(6):949-59.
- 26.- Cox MM. *Motoring along with the bacterial RecA protein*. 2007. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(2):127-38.
- 27.- De Palmenaer D, Siguier P, Mahillon J. *IS4 family goes genomic*. 2008. *BMC Evol Biol*. 23;8:18.
- 28.- Mebrhatu M T, Wywial E, Ghosh A, Michiels CW, Lindner AB, Taddei F, Bujnicki JM, Van Melderen L, Aertsen A. *Evidence for an evolutionary antagonism between Mrr and Type III modification systems*. 2011. *Nucleic Acids Res*. 39(14):5991-6001.
- 29.- McDonnell GE, McConnell DJ. *Overproduction, Isolation, and DNA-Binding Characteristics of Xre, the Repressor Protein from the Bacillus subtilis Defective Prophage PBSX*. 1994. *J Bacteriol*. 176(18):5831-4.
- 30.- Kinch L. N., Ginalski K., Rychlewski L., Grishin N. *Identification of novel restriction endonuclease-like fold families among hypothetical proteins*. 2005. *Nucleic Acids Res*. 33(11): 3598–3605.
- 31.- Topham MK, Prescott SM. *Diacylglycerol kinases: regulation and signaling roles*. 2002. *Thromb Haemost*. 2002. 88(6):912-8.
- 32.- Warburton P., Roberts A.P., Allan E., Seville L., Lancaster H., Mullany P. *Characterization of tet(32) Genes from the Oral Metagenome*. 2009. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(1): 273–276.
- 33.- Chopra I., Roberts M. *Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance*. 2001. *Microbiol Mol Biol Rev*. 65(2): 232–260.
- 34.- Crellin P. K., Rood J. I. *The resolvase/invertase domain of the site-specific recombinase TnpX is functional and recognizes a target sequence that resembles the junction of the circular form of the Clostridium perfringens transposon Tn4451*. 1997. *J Bacteriol*. 179(16): 5148–5156.
- 35.- Wang H., Roberts A. P., Lyras D., Rood J. I., Wilks M., Mullany P. *Characterization of the Ends and Target Sites of the Novel Conjugative Transposon Tn5397 from Clostridium difficile: Excision and Circularization Is Mediated by the Large Resolvase, TndX*. 2000. *J Bacteriol*. 182(13): 3775–3783.
- 36.- Billington S.J., Jost B.H. *Multiple Genetic Elements Carry the Tetracycline Resistance Gene tet(W) in the Animal Pathogen Arcanobacterium pyogenes*. 2006. *Antimicrob Agents Chemother*. 50(11): 3580–3587.
- 37.- Jeon J., Yang J., Kim S. *Integration of Evolutionary Features for the Identification of Functionally Important Residues in Major Facilitator Superfamily Transporters* 2009. *PLoS Comput Biol*. 5(10).
- 38.- Claire M. Melville, Romain Brunel, Harry J. Flint, Karen P. Scott. *The Butyrivibrio fibrisolvens tet(W) Gene Is Carried on the Novel Conjugative Transposon TnB1230, Which Contains Duplicated Nitroreductase Coding Sequences*.

2004. J Bacteriol. 186(11): 3656–3659.

39.- Mingoia M., Tili E., Manso E., Varaldo P. E., Montanari M. P. *Heterogeneity of Tn5253-Like Composite Elements in Clinical Streptococcus pneumoniae Isolates*. 2011. Antimicrob Agents Chemother. 55(4): 1453–1459.

Parte IV

Discusión

1. Análisis de las estructuras genéticas y el origen del elemento IG-ACI-1.

1.1 Reconstrucción de los posibles eventos de movilización ocurridos para la formación de la estructura genética de IG-ACI-1.

IG-ACI-1 es el primer elemento genético portador de una β -lactamasa funcional (*bla*_{ACI1}) descrito en un coco anaerobio. Es una estructura de gran tamaño (100.778 pb.), constituida por genes de diverso origen. Estos genes parecen agruparse merced a determinados eventos de inserción hipotéticos, que es razonable sugerir aquí. Contiene tres transposasas pertenecientes a Secuencias de Inserción (IS200 y dos relacionadas con IS4, cuya identidad entre ambas es de menos del 23% a nivel aminoacídico en la región que va del aminoácido 180 al 360). Asimismo, posee una integrasa (*orf* 103, situada junto a la β -lactamasa) que aparece también en los géneros *Dialister*, *Selenomonas*, *Phascolarctobacterium* y *Bacteroides*. Los *orf* de origen fágico abundan en la estructura, particularmente los procedentes de PBSX, aunque también de otros fagos como Sal2 de *Lactobacillus* (*orf* 9), los fagos de *Bacillus* BCJA1C (*orf* 13 y *orf* 15) y SPP1 (*orf* 23). Hasta 3 *orf* (*orf* 84, *orf* 11 y *orf* 112) tienen identidad con el fago de *Streptococcus* 10270.2. Además, hasta 7 *orf* más podrían proceder de este virus, aunque el menor porcentaje de identidad a nivel nucleotídico y aminoacídico no permiten confirmar esta aseveración.

En lo que respecta a los hipotéticos fenómenos de inserción y delección que han configurado la estructura actual de IG-ACI-1 en la cepa RYC-MR95, existen algunos indicios que nos permiten especular sobre varias posibilidades alternativas. En primer lugar, existen varios *orf* correspondientes a la proteína XkdT, perteneciente al profago defectivo PBSX. Los *orf* 33, 77, 78 y 105 codifican para esta proteína. En realidad, el *orf* 33 y 77 son dos copias completas del gen que codifica para XkdT. Esta duplicación podría ser indicio de un evento de inserción de toda una región central comprendida entre estos, conteniendo *orf* procedentes mayoritariamente de PBSX (en la figura 1 esta región aparece recuadrada en rojo). Por otra parte, el *orf* 78 es una versión truncada, incompleta, del gen de PBSX. Es posible que haya quedado como resquicio del evento de inserción anterior. Por su parte, el *orf* 105, situado corriente abajo de la β -lactamasa, dentro del segmento central del elemento, corresponde a la región amino terminal de XkdT, que va desde el aminoácido 1 al 90. Parece lógico pensar que el gen que codifica XkdT corresponde a un posible módulo en PBSX que resultó integrado en algún momento evolutivo en la estructura de IG-ACI-1, al menos en una ocasión, advirtiéndose varias marcas de este evento. También podría considerarse el fragmento que va desde el *orf* 78 al 105 como una posible unidad de recombinación, aunque las evidencias en

este caso se limitan a las secuencias parciales, truncadas, de XkdT ya detalladas, como marcas de este evento (llave con el número 2 en la figura 1).

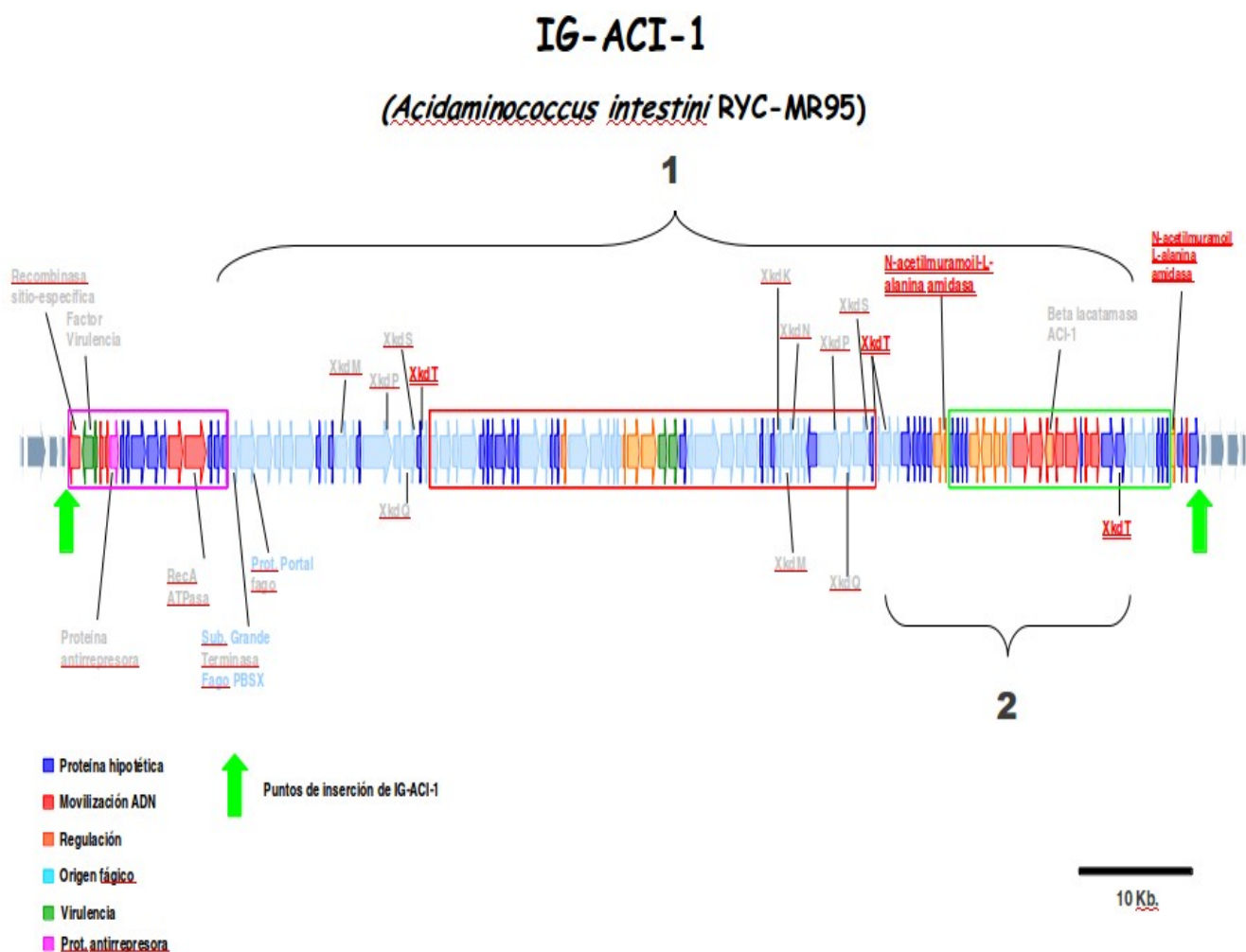


Figura 1.- Representación esquemática de los hipotéticos eventos de inserción que han podido configurar la estructura genética del elemento IG-ACI-1. En rojo se destacan los genes (completos o truncados) correspondientes a la proteína XkdT, del profago defectivo PBSX, cuya posición podría estar determinando marcas de hasta dos eventos de movilización. También se señala en rojo la posición de las dos copias del gen que codifica para la N-acetilmuramoi-L-alanina amidasa, otra hipotética marca de inserción por recombinación sitio específica. Los recuadros indican posibles unidades de inserción o módulos. La llave 1 señala una región mayoritariamente constituida por genes procedentes de PBSX. Las llave 2 indica los límites de otro posible evento de recombinación, flanqueado por dos copias truncadas del gen de XkdT.

Por otro lado, y en el mismo sentido, se encuentra otra marca de un posible evento de inserción. Se trata de los *orf* 86 y 111. Ambos aparecen flanqueando la estructura central de IG-ACI-1, en la cual se incluye la β -lactamasa. Ambos *orf* codifican para la enzima N-acetil muramoi-L-alanina amidasa. Son dos copias situadas en lo que podríamos considerar los extremos 5' y 3' del fragmento central de IG-ACI-1, el mejor conservado y que podría de este modo

considerarse una unidad individual de recombinación (la región aparece recuadrada en verde en la figura 1).

Una estructura mínima (el núcleo, dentro de este grupo central de genes), constituida por la β -lactamasa ACI-1, el sistema de dos recombinasas en tandem (*dra1* y *dra2*) y los *orf* correspondientes a las transposasas de las secuencias de inserción (IS200 e IS4) aparecen como unidad genética transmisible discreta en al menos el genoma de *Phascolarctobacterium*. Esto constituye una prueba indirecta del funcionamiento como unidad mínima transmisible de este módulo (Resultados: figura 9). El módulo podría haberse integrado en alguna otra estructura mayor, análoga a IG-ACI-1, en *Phascolarctobacterium*. En este sentido, existen ejemplos como el estudio del elemento *mega* (*mef*(E)-*Carrying Genetic Element*) de *Streptococcus pneumoniae* (1). Este elemento porta el gen *mefA*, que codifica una bomba de eflujo para la resistencia a macrólidos, así como, en algunos casos, otros determinantes de resistencia como *tet*(M) o *ermB*, de resistencia a tetraciclina y eritromicina respectivamente. Se ha demostrado que *mega* aparece insertado en diferentes contextos genéticos, formando parte de elementos como Tn2009, Tn2010 o Tn3872, todos ellos del tipo Tn916. El elemento *mega* se ha encontrado formando parte de estas estructuras, integradas a su vez en el cromosoma, en *loci* genómicos diferentes, constituyendo el núcleo central del elemento. Es importante relacionar estos hechos con la idea de modularidad genética y plasticidad en la evolución de los genomas bacterianos, que plantearemos al final de esta discusión.

Finalmente, a pesar de no haberse identificado marca genética alguna, por la disposición agrupada y la naturaleza funcional común de sus *orf* podría especularse con la posibilidad de la existencia de un nuevo grupo de genes adquiridos por un evento de movilización (recuadrado en fucsia en la figura 1). Se trata del grupo situado en el extremo 5' de IG-ACI-1, caracterizado por la presencia de una recombinasa específica de sitio (*orf1*), y una RecA Atpasa (*orf 11*), genes hipotéticamente relacionados con su movilización. Este fragmento hipotéticamente automovilizable portaría dos *orf* relacionados con factores de virulencia (*orf 2* y *orf 3*).

1.2 Diseminación del elemento IG-ACI-1.

IG-ACI-1 aparece en un número significativo (24%) de cepas de *Acidaminococcus* en las colecciones RYC y HAV. Entre los elementos de estas cepas, entre cada copia de IG-ACI-1, existen diferencias parciales. Resulta interesante constatar que cepas sensibles son portadoras del elemento, careciendo de los *orf* correspondientes al gen *bla_{aci1}* (*orf 102*) y a la trasposasa de IS3 (*orf 103*). Del

mismo modo, es posible identificar *loci* discretos cuyos *orf* faltan en algunas de las copias del elemento, cuando éstas se comparan con IG-ACI-1 en la cepa RYC-MR95 (Resultados: figuras 7 y 18). En concreto, es posible sugerir como *puntos calientes* de delección al menos los *loci* que van desde el *orf* 49 al 52, del *orf* 62 al 69, del *orf* 73 al 76, y del *orf* 84 al 89. Dichas regiones se corresponden con *orf* estructurales del profago defectivo PBSX, así como varias metilasas y metiltransferasas.

Estos datos parecen sugerir que el elemento de la cepa RYC-MR95 fuera la estructura máxima a partir de la cual se produjo, en sucesivos eventos de delección, la eliminación de algunos grupos de genes de manera selectiva. Estos genes podrían haber sido eliminados bien por la pérdida de funcionalidad de los mismos, lo que haría desfavorable su mantenimiento en el genoma, bien por hipotéticos eventos de movilización o recombinación. Esta línea de pensamiento lleva a plantear que el elemento se introdujese en la línea de *Acidaminococcus* en un momento ancestral en la historia evolutiva del género, idea contraria en principio a considerar este elemento como vehículo de movilización genética en la actualidad. IG-ACI-1, según esta idea, quedaría como un resto de lo que en algún momento fue un elemento efectivamente movilizable.

Con objeto de corroborar esta situación, o bien afirmar la contraria, se llevaron a cabo varios experimentos, con dos abordajes diferentes: por un lado, la construcción de árboles filogenéticos a partir de la secuencia comparada de diferentes genes, tanto *orf* del elemento como genes cromosómicos conservados, con objeto de inferir el momento en la evolución en que el primero se había introducido en el acervo genético de *Acidaminococcus*, lo cual aportaría sólidos indicios en favor de un origen ancestral o bien de su adquisición por transferencia génica horizontal en un momento reciente de la evolución. También se consideró en este tipo de abordaje la búsqueda en las bases de datos del elemento o de estructuras del mismo y su estudio comparativo, en bacterias relacionadas o no filogenéticamente.

Un segundo tipo de experimentos pretendía probar la efectiva movilización *in vivo* del elemento en estas bacterias anaerobias, lo cual justificaría su validez como vehículo actual de transferencia. Para ello se probó su clonación en *Acidaminococcus* y su movilización provocada por irradiación con luz UV.

Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando la secuencia de genes que se hipotetiza son importantes en la fisiología de IG-ACI-1 como elemento de TGH, o bien que aparecen conservados en la misma, tales como el gen que codifica para XkdT (del fago defectivo PBSX de *Bacillus subtilis*, gen altamente conservado en el elemento) y sobre todo los genes *dra1* y *dra2*, que

codifican para las recombinasas en tándem que son hipotéticamente responsables necesarias y suficientes de la movilización del elemento. Por otro lado, como control positivo, se construyeron árboles filogenéticos utilizando la secuencia de ADN que codifica para el ARNr 16S de *Acidaminococcus intestini* y *A. fermentans*, así como la secuencia de genes cuya secuencia está altamente conservada considerados *housekeeping* en la especie, principalmente el gen *gctA*.

El árbol filogenético resultante de utilizar la secuencia de genes centrales en IG-ACI-1 no permite reconstruir el esquema evolutivo del grupo taxonómico de *Acidaminococcus*. Los árboles no son coincidentes, sino que el construido empleando la secuencia de recombinasas semejantes no reproduce la filogenia del grupo.

Este resultado aporta fundamento a la hipótesis que sugiere que IG-ACI-1 es un elemento genético móvil que ha sido adquirido en un momento reciente en la evolución de *Acidaminococcus*. Existen además otros indicios claros, como se ha mostrado a lo largo de esta tesis. Fundamentalmente dos parecen, a nuestro juicio, determinantes: en primer lugar el hallazgo de las secuencias de inserción directamente repetidas flanqueando ambos extremos del elemento. La longitud de esta secuencia y la identidad entre ambas copias (54 pb, con una identidad del 96,4% entre ambas, tan solo dos pares de bases no coinciden) sustenta estadísticamente su consideración como dianas de recombinación.

En segundo lugar, lo que definitivamente prueba, a nuestro juicio, esta consideración es el haber encontrado esta secuencia en una sola copia justamente en el mismo *locus* (esta vez vacío, sin estar presente el elemento) en una cepa de *Acidaminococcus* sp. D21. Ello prueba tanto que esta secuencia de 54 pb. es la diana de recombinación como que el elemento es movilizable, al existir ejemplos de cepas con un mismo *locus* ocupado o vacío. También el hecho de haberse localizado únicamente dos *loci* de inserción específicos, ocupados en cepas alternas.

Consecuentemente, si aceptamos esta hipótesis, es razonable pensar que IG-ACI-1 esté sirviendo de vehículo de movilización de resistencias desde especies reservorio como las del género *Acidaminococcus*, hacia hospedadores patógenos. Como control positivo, los resultados obtenidos al utilizar genes conservados, reconstruye, como cabe esperar, el árbol filogenético de los *Negativicutes*.

1.3 Mecanismo de movilización de IG-ACI-1. Sistemas de doble recombinasa.

Llegados a este punto, queda plantearnos: ¿cuál puede ser el mecanismo de movilización de IG-ACI-1?. Sobre el particular, los experimentos de movilización *in vivo* resultaron, desgraciadamente infructuosos. La carencia de herramientas moleculares, y el carácter tentativo de estos experimentos ha sido causa fundamental de la falta de resultados a este respecto.

En el momento de la finalización de esta tesis, aparece por primera vez en la literatura un trabajo donde se presenta un primer protocolo para la transformación de una cepa anaerobia del tracto gastrointestinal humano, en concreto en el género *Veillonella* (2,3). No obstante, para ello se utiliza un plásmido endógeno (pVJL1) aislado de una cepa clínica, cuya eficacia en *Acidaminococcus* no es ni mucho menos evidente. Sin embargo, este primer avance sobre el particular es esperanzador con vistas a futuras investigaciones en los *Negativicutes*. Por lo que respecta a las pruebas en *E. coli*, la longitud del elemento hace necesario, posiblemente, el seleccionar fragmentos discretos del mismo para probar su capacidad de movilización. Es sin duda un ensayo a realizar en el futuro.

A pesar de lo anteriormente expuesto, no puede dejarse de hacer referencia a una particularidad del elemento IG-ACI-1 de gran importancia.

Como se ha descrito, posee un sistema de dos recombinasas dispuestas en tándem, una a continuación de la otra e inmediatamente adyacentes y corriente abajo a la *bla_{ACI1}*. No es la primera vez que se describe un sistema similar a éste.

La isla genómica *SCCmec* (de *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) (4) es la responsable de la movilización del gen *mecA*, que codifica resistencia a meticilina y otros antibióticos β -lactámicos en el género *Staphylococcus*. La proteína codificada por el gen *mecA* es una proteína de unión a penicilina PBP2a, poseedora de actividad transpeptidasa resistente a los β -lactámicos.

Se ha demostrado que la movilización de *SCCmec* es debida a un proceso de recombinación específica de sitio catalizada por proteínas recombinasas codificadas en los genes *ccr*. Se distinguen varias islas genómicas *SCCmec*, clasificándolas dependiendo de la secuencia de los genes *mec* y *ccr* que posean, los cuales constituyen el núcleo central de la isla.

Las islas genómicas *SCCmec* de los tipos I a IV poseen dos recombinasas, *ccrA* y *ccrB*. Se ha demostrado que ambas recombinasas son necesarias y suficientes para catalizar la recombinación específica de sitio de estas islas *SCCmec*. El conjunto de ambas actividades, excisionasa e integrasa, son necesarias para el reconocimiento de los sitios de integración *att* y para la movilización del elemento (5). Se da la particularidad de que ambos genes están posicionados en tándem en la isla genómica. Esta misma circunstancia ocurre con los genes *dra1* y *dra2*, responsables de codificar para dos serina-recombinasas (nuevamente una excisionasa y una integrasa) en la isla genómica IG-ACI-1 descrita en este trabajo. Parece razonable pensar que ambos genes sean los responsables necesarios y suficientes de la movilización del elemento genético que nos ocupa, en concordancia con las evidencias indirectas a favor de la hipótesis propuesta.

2. El gen *tet32* se moviliza en un transposón conjugativo.

En este trabajo se presenta el primer elemento genético portador del determinante de resistencia a tetraciclina *tet*(32). Su estructura de 11,628 pb. está compuesta de 5 grupos de secuencias de lectura abiertas, identificados de acuerdo con su hipotética función al rastrear en las bases de datos las secuencias con las que presentan alta identidad, tanto a nivel de nucleótido como a nivel de aminoácido. Recombinación, movilización, replicación, regulación transcripcional y actividad transferasa (fosfotransferasa y metiltransferasa), son los grupos funcionales hipotéticos identificados.

La región de recombinación incluye un *orf* cuyo producto es una hipotética serin-recombinasa de gran tamaño, exclusivamente descritas en bacterias Gram-positivas como TnpX o TndX de *Clostridium perfringens* y *C. difficile* (6, 7). Estas serin-recombinasas implicadas en varios sistemas de transferencia horizontal de bacterias Gram-positivas como la resistencia a meticilina en *S. aureus* o la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*, podrían por sí solas realizar todo el proceso de escisión, transferencia e integración, como en cualquier transposón conjugativo tipo Tn916. La diferencia fundamental entre esos sistemas descritos y el aquí presentado es el número de copias de la recombinasa: dos copias en tándem en *S. aureus* o *S. pyogenes* y solo una en *Acidaminococcus*. El modelo, ya mencionado en el apartado anterior y descrito en el caso de IG-ACI-1, de dos recombinasas en tándem con capacidad para realizar todo el proceso de transferencia horizontal propuesto por Smith y Thorpe (8) como el resultado de un proceso de duplicación génica y posterior especialización, no se da en este caso. Alternativamente, el modelo de transposón conjugativo portador de *tet*(32) aquí presentado contiene sólo una recombinasa, que podría realizar las funciones de escisión e integración. Existen además otras proteínas hipotéticas relacionadas con los procesos de movilización e inicio de la conjugación. Este esquema es similar al Tn916, pero la recombinasa es de un tamaño mucho mayor a la integrasa del Tn916 y se parece más a las recombinasas de SSCmec. Por lo tanto, el modelo del elemento transponible portando *tet*(32) en *Acidaminococcus intestini* tiene un carácter híbrido entre el modelo clásico Tn916 (9) o los modelos tipo SCCmec, siendo más cercano a transposones como Tn5397 (10) descrito en *C. difficile*, portando el determinante de resistencia a tetraciclina *tet*(M), único transposon conjugativo que porta una serin-recombinasa, todos los demás portan tirosin-recombinasas (o integrasas).

Otra interesante diferencia entre el modelo aquí propuesto y un transposón conjugativo clásico es el orden en el que aparecen los módulos (Resultados: figura 24).

El módulo de conjugación está corriente arriba del determinante de resistencia en Tn916, mientras que en este modelo se encuentra después del módulo de regulación. En Tn916, hasta 11 *orf* están relacionados con la conjugación/movilización mientras que en *A. intestini* aparecen tan solo dos *orf*: la relaxasa, proteína encargada de hacer una mella en el ADN para iniciar la conjugación (*oriT*) y MobC, careciendo de todas las grandes proteínas relacionadas con proteínas de membrana (que corresponden a los *orf* de mayor tamaño del transposón), aunque sí presenta la proteína excinucleasa (*orf20* en Tn916), perteneciente la familia de P-loop-NTPasa. Por lo que podemos concluir que el modelo de elemento portando *tet(32)* en *A. intestini* es con alguna particularidad un transposon conjugativo.

El hipotético grupo funcional de replicación presenta identidad con dos *orf* que codifican proteínas hipotéticas de replicación de origen fágico. En el elemento, este grupo de replicación está inmediatamente rodeado por dos *orf* que codifican para proteínas hipotéticas truncadas. Es posible que su presencia sean restos de un evento de recombinación ocurrido que resultó con la inserción de este grupo, como se ha dicho de procedencia fágica. La replicación no es una función esencial en los transposones conjugativos, dado que no necesita ser capaz de replicarse por sí mismo para mantenerse, puesto que o bien se integra en el cromosoma o bien va asociado a otro elemento capaz de mantenerlo (como por ejemplo, un plásmido). Es posible barajar la hipótesis, en el caso de este elemento, de que las replicasas no estuviesen presentes en un hipotético ancestro y que llegasen por recombinación procedentes de un fago, aportando esta función al elemento. En cuanto a las transferasas, la metiltransferasa tiene una identidad del 27% (a nivel aminoacídico) con la región central del *orf27* del módulo de conjugación de Tn1549, con lo que podríamos considerarla como parte del grupo de *orf* relacionados con la función de conjugación. La fosfotransferasa no presenta homología suficiente con las proteínas codificados por ningún *orf* del módulo de conjugación de Tn916. Su función última en el elemento es, por tanto, difícil de inferir en este momento. Si comparamos la estructuración de este elemento con la generalidad de este tipo de transposones, en especial con los derivados o similares a Tn916, observamos que el elemento portador de *tet(32)* en *Acidaminococcus* presenta una estructura considerablemente reducida, si bien existen casos de estructuras de tamaño similar e incluso menor (Tn1116 tiene 7.5Kb) (11) que son clasificadas como transposones conjugativos. A su vez, se han identificado claramente en el elemento regiones con alta identidad con transposones conjugativos, habitualmente portadores de genes de resistencia a tetraciclina, en concreto Tn916, TnB1230 y Tn5253 (11). Todas las regiones del elemento muestran relaciones de identidad con otros elementos, quizá con un origen relacionado, identificados

previamente como portadores principalmente de *tet*(M) y *tet*(W).

En lo que se refiere a la capacidad de movilización de este transposón conjugativo, a día de hoy, no se han obtenido resultados en los ensayos de movilidad llevados a cabo. Los experimentos de conjugación entre *A. intestini* RYC-MR95 con *Streptococcus oralis* CECT 805 (sensible a tetraciclina) seleccionando con antibiótico y en aerobiosis fueron infructuosos. El hecho de ser un transposón conjugativo sugiere que en algún momento fue un elemento móvil. Aunque hasta el momento su movilidad actual no ha sido demostrada de manera directa, es razonable esperar que esta lo sea próximamente. En este sentido, estudios de genómica comparada nos muestran una alta identidad (>95% a lo largo del elemento) con especies como *Clostridium scindens* y *Anaerotruncus colihominis* o *Streptococcus salivarius*, con quien *A. intestini* muestra una identidad a nivel de 16S rDNA entorno al 81%, 82% y 82% respectivamente, sugiriendo un proceso de transferencia horizontal reciente. Esta evidencia indirecta sugeriría su capacidad actual de movilización.

3. Plasticidad genómica y teoría modular.

A la vista de los datos presentados en este trabajo, surge una idea que subyace en todo ello y que parece adecuado comentar a modo de epílogo. Las estructuras que se han presentado se caracterizan por estar conformadas por diferentes grupos de genes, los cuales tienen un origen determinado, generalmente asociados a fagos o constituidos por proteínas capaces de movilización (como las transposasas o recombinasas) y por factores que aportan algún tipo de función al conjunto.

Estos grupos de genes constituyen de algún modo grupos que posiblemente se transmiten ligados, unidades discretas transmisibles como un grupo coherente, determinadas por marcas testigo de eventos de movilización anteriores.

En algunos casos, no es posible identificar estas marcas que efectivamente nos indiquen su modo de inserción. En la figura 2 se han representado las tres estructuras tipo IG-ACI en las cepas *Acidaminococcus intestini* RYC-MR95 y *Acidaminococcus* sp. D21.

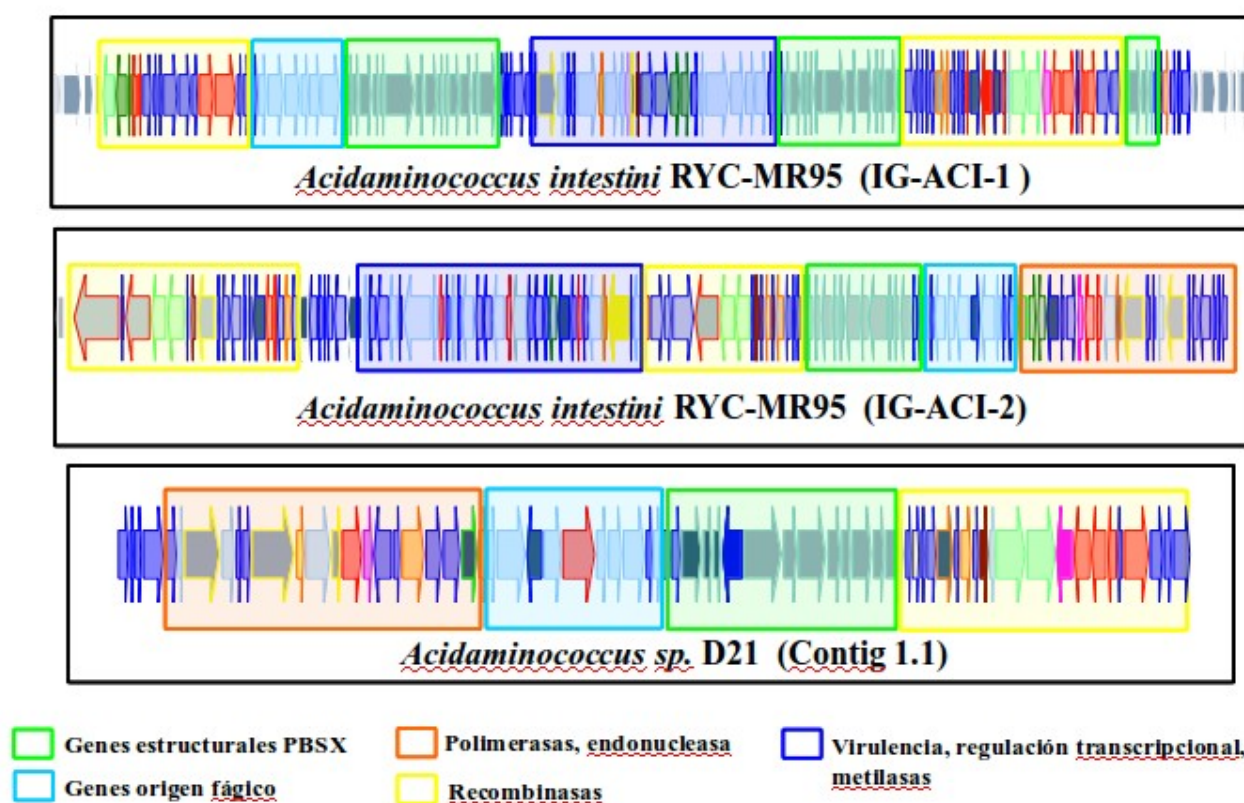


Figura 2.- Representación esquemática de los elementos IG-ACI-1 e IG-ACI-2, de *Acidaminococcus intestini* RYC-MR95, y el elemento tipo IG-ACI encontrado en *Acidaminococcus* sp. D21. Aparecen recuadrados por colores aquellos grupos de genes que tienen una estructura similar, considerando la posición respectiva de cada *orf* y la función hipotética que se atribuye a cada uno.

El criterio para realizar esta figura consistió primero en marcar cada *orf* de un color dependiendo de la función hipotética que se les atribuye tras el trabajo de anotación de los elementos, seguidamente, se trató de identificar patrones de distribución similares a lo largo del elemento, es decir, si estos *orf* se agrupaban de alguna manera entre ellos, tratando de encontrar similitudes identificables. Así, en la figura aparecen recuadrados con el mismo color a lo largo de las tres estructuras aquellos grupos de genes que aparecen espacialmente relacionados en la secuencia y que, a su vez, contienen genes con funciones iguales o similares en cada caso.

Atendiendo a esta figura, puede apreciarse cómo, en los elementos IG-ACI, pueden apreciarse patrones *modulares* de construcción, grupos de genes de función relacionada que se han podido heredar de manera conjunta, como un todo discreto. En este caso concreto, se pueden identificar hasta cinco grupos o módulos diferentes (genes estructurales de PBSX; de origen fágico; recombinasas; polimerasas, endonucleasas y otros genes relacionados con el metabolismo del ADN; factores de virulencia, de regulación transcripcional y metilasas).

La acreción de distintos de estos módulos en cada caso ha permitido la construcción de elementos que, en su conjunto, tienen una función determinada, gracias a la coordinación de los aportes individuales de cada módulo. Es lógico pensar que cada uno de estos módulos podrá a su vez combinarse, a partir de un número limitado de elementos y mediante un número discreto de posibilidades, hasta conformar al menos una estructura mínima funcional, para constituir nuevos elementos sucesivos en el futuro.

Por lo que respecta a la resistencia a tetraciclina, se han encontrado diversas especies de microorganismos anaerobios en el intestino que portan estos genes, incluso varias copias de tipos diferentes de genes *tet* en la misma cepa (12). Asimismo, se han identificado determinantes de resistencia a tetraciclina en mosaico, como resultado de recombinaciones internas de diferentes tipos de genes no mosaico de resistencia a tetraciclina. Entre nuestras cepas, varias de ellas son portadoras de forma simultánea de al menos dos tipos diferentes de genes de resistencia a tetraciclina, *tet*(32) y *tet*(W). Estos genes presentan un porcentaje de identidad bastante elevado (\approx 70% a nivel de nucleótido), así como aparecen en ramas del mismo *cluster* si analizamos sus relaciones a nivel filogenético. Así pues, la aparición y selección de genes mosaico *tet*(32/W), y, eventualmente, *tet*(32/W/O) es solamente una cuestión de tiempo. Es decir, el fenómeno no se limita a estructuras mayores, a transposones o islas genéticas movilizables: parece fundamentado pensar que es un proceso que sucede de la misma forma a nivel de cada gen individual.

Los elementos genéticos relacionados con la resistencia a tetraciclina en sí mismos son estructuras con gran plasticidad. Los transposones conjugativos permiten la coexistencia de copias de diferentes transposones. Muy diversas combinaciones son posibles entre los elementos constitutivos de los diferentes transposones conjugativos y también entre los distintos genes *tet*. Ejemplo paradigmático de ello son todos los transposones conjugativos de la familia de Tn916. Una revisión reciente (11) nos señala este mismo hecho, al repasar las estructuras de los transposones de esta familia y constatar cómo los diferentes transposones conjugativos mantienen una identidad a nivel modular, cuyos patrones de transmisión son reconocibles.

De modo similar, es altamente esperable que las combinaciones de módulos que forman parte de elementos de movilización genética conocidos den lugar a la generación de nuevas reorganizaciones funcionales. El tracto gastrointestinal, y en concreto los anaerobios estrictos no patógenos, son ejemplos de cómo la plasticidad bacteriana es capaz de desarrollar nuevas posibilidades de combinaciones modulares y de diseminarlas ampliamente por medio de la transferencia genética horizontal. Estas capacidades permiten a estas especies constituir reservorios genéticos activos, donde las resistencias a los antibióticos se diseminan a especies patógenas junto a las que viven en íntimo contacto en el ecosistema.

Siguiendo esta línea de razonamiento, podemos considerar a los *Negativicutes* como una clase de bacterias de naturaleza quimérica. De hecho, es esta su característica más peculiar: bacterias fenotípicamente Gram negativas pero genotípicamente próximas a los Gram positivos. Este grupo de bacterias parece poseer un acervo de genes de resistencia a los antibióticos considerable, siendo sin embargo bacterias generalmente no patógenas. Es posible considerar que este hecho responda a su naturaleza como reservorio genético de los mismos, seleccionándose este grupo al ser capaces de transmitir eficientemente estos genes. La eficiencia de sus maquinarias de transmisión queda patente en la propia estructura genética del grupo, previsiblemente de marcado carácter modular.

En los últimos años, la transferencia genética horizontal se está estableciendo como un mecanismo evolutivo principal en las bacterias. Como apuntan Dagan y col. (13), el impacto de la transferencia genética lateral u horizontal en la evolución de los genomas de procariotas es una clave importante. A pesar de la indudable utilidad de los árboles filogenéticos a la hora de interpretar la evolución de los genomas bacterianos, a medida que nuevas aproximaciones nos revelan extremos tales como que la transferencia horizontal está presente en una mayoría de genes en la evolución del genoma de *E. coli*, lo cual nos hace esperar el mismo comportamiento en una mayoría de especies

bacterianas, los nuevos modelos basados en redes que permiten considerar la acción paralela de la TGH deben ser desarrollados y potenciados. Estos modelos podrán incluir datos relativos a la incorporación en los genomas de genes muy alejados, en principio ajenos, lo cual es un hecho habitual en la adquisición de resistencia frente a los antibióticos. Estos datos deben integrarse de modo que permitan considerar el efecto evolutivo de este mecanismo en su justa proporción. Cuando estos datos se reflejen más adecuadamente, la reconstrucción de la Historia Evolutiva se hará de manera más realista, permitiéndonos conocer con mayor precisión lo que ocurre verdaderamente en la naturaleza.

El interés por las bacterias anaeróbicas que pueblan el tracto gastrointestinal humano está incrementándose en la actualidad. El proyecto del Microbioma Humano está posibilitando el conocimiento de nuevas especies y la secuenciación de las más paradigmáticas. Su estudio en el futuro será de gran utilidad a nivel clínico, dado que, como se ha defendido en este trabajo, parece que constituyen una reserva genética, actuando como mediadores en la transferencia horizontal de la resistencia a los antibióticos, así como de otro tipo de determinantes genéticos.

Los anaerobios no patogénicos son la subpoblación dominante en el intestino. A medida que el conocimiento sobre su genética aumenta, lo hace también la evidencia sobre su papel silencioso pero probablemente fundamental como intermediarios en la diseminación de la resistencia a los antibióticos. Se debe promover una mayor profundidad en la investigación de la diversidad de la microflora intestinal y sus relaciones ecológicas y evolutivas, con objeto de llegar a una mejor comprensión de un ecosistema tan importante como éste, que sin duda influye de manera determinante en la salud humana y animal.

4. Referencias.

- 1.- Del Grosso M, Camilli R, Iannelli F, Pozzi G, Pantosti A. *The mef(E)-carrying genetic element (mega) of Streptococcus pneumoniae: insertion sites and association with other genetic elements*. 2006. Antimicrob Agents Chemother. 50(10):3361-6.
- 2.- Liu J, Xie Z, Merritt J, Qi F. *Establishment of a tractable genetic transformation system in Veillonella spp.* 2012. Appl Environ Microbiol. 78(9):3488-91.
- 3.- Liu J, Merritt J, Qi F. *Genetic transformation of Veillonella parvula*. 2011. FEMS Microbiol Lett. 322(2):138-44.
- 4.- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. *A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. 2000. Antimicrob Agents Chemother. 44(6):1549-55.
- 5.- Wang L, Archer GL. *Roles of CcrA and CcrB in excision and integration of staphylococcal cassette chromosome mec, a Staphylococcus aureus genomic island*. 2010. J Bacteriol. 192(12):3204-12.
- 6.- Lucet IS, Tynan FE, Adams V, Rossjohn J, Lyras D, Rood JI. *Identification of the structural and functional domains of the large serine recombinase TnpX from Clostridium perfringens*. 2005. J Biol Chem. 280(4):2503-11.
- 7.- Wang H, Roberts AP, Lyras D, Rood JI, Wilks M, Mullany P. *Characterization of the ends and target sites of the novel conjugative transposon Tn5397 from Clostridium difficile: excision and circularization is mediated by the large resolvase, TndX*. 2000. J Bacteriol. 182(13):3775-83.
- 8.- Smith MC, Thorpe HM. *Diversity in the serine recombinases*. 2002. Mol Microbiol. 44(2):299-307.
- 9.- Clewell DB, Flannagan SE, Jaworski DD. *Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons*. 1995. Trends Microbiol. 3(6):229-36.
- 10.- Agersø Y, Pedersen AG, Aarestrup FM. *Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) in enterococci from humans, pigs and poultry*. 2006. J Antimicrob Chemother. 57(5):832-9.
- 11.- Roberts AP, Mullany P. *A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements*. 2009. Trends Microbiol. 17(6):251-8.
- 12.- Roberts M. *Update on acquired tetracycline resistance genes*. 2005. FEMS Microbiology Letters. 245; 195–203.
- 13.- Dagan T, Artzy-Randrup Y, Martin W. *Modular networks and cumulative impact of lateral transfer in prokaryote genome evolution*. 2008. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(29):10039-44.

Conclusiones.

- Caracterización de IG-ACI-1, el primer elemento genético completo portador del determinante de resistencia a los β -lactámicos *bla*_{ACII}.
- Identificación de la secuencia diana de inserción de IG-ACI-1, de 54 pb. (ATTTCGGAAAATAATAATGAAACGGCCCGTATCCCTTGTGGATACGGGCTTTT). Esta secuencia aparece directamente repetida flanqueando los extremos del elemento. Se ha identificado una única copia de esta secuencia en la cepa *Acidaminococcus* sp. D21, en un *loci* cromosómico en el cual no estaba presente IG-ACI-1, pero que se sabe es punto de inserción al encontrarse ocupado por el elemento en *A. intestini* RYC-MR95. Este hecho confirma la naturaleza de la secuencia como diana de recombinación.
- Identificación de un sistema de doble recombinasa consituido por dos genes que codifican para dos serina recombinasas (*dra1* y *dra2*) dispuestos en tándem. Estas recombinasas, similares a *ccrA* y *ccrB*, responsables de la movilización de la isla genética SCC*mec* en *Staphylococcus*, son con hipotéticamente las responsables de la movilización de IG-ACI-1.
- Evidencia, mediante estudios filogenéticos, de la capacidad de movilización de elemento IG-ACI-1.
- Caracterización de diferentes variantes de IG-ACI-1 en distintas cepas del género *Acidaminococcus* (presente en el 24% de las cepas de las colecciones RYC y HAV). Estas variantes evidencian la naturaleza modular de este elemento. Se describen módulos discretos de IG-ACI-1 en otras especies dentro de la clase de los *Negativicutes*.
- Identificación del gen *tet(32)* no mosaico en cepas de *Acidaminococcus intestini*. Se observó una alta prevalencia de *tet(32)* en las cepas de la colección empleada (27%).
- Identificación del primer elemento genético completo portador del determinante de resistencia a tetraciclina *tet(32)*, donde se definen claramente 3 módulos relacionados con la transferencia horizontal: Recombinación, Replicación y Movilización y un 4º módulo relacionado con la expresión de *tet(32)*: Reguladores transcripcionales tipo

HTH.

- La región alrededor de *tet*(32) presenta identidad con los elementos caracterizados que portan otros determinantes de resistencia tipo *tet* como *tet*(M) (identidad del módulo de movilización con Tn916), o con *tet*(W) con identidad a nivel del módulo de recombinación.
- Son detectados genes *tet*(W) no mosaico en cepas de *Acidaminococcus*. Queda evidenciada la coexistencia de genes *tet*(W) y *tet*(32) en una misma cepa. Por otra parte, la identidad entre las regiones flanqueantes de *tet*(32) y *tet*(W) son aproximadamente del 96%, lo que permite eventos de recombinación entre ambos entornos facilitados por poseer una recombinasa sitio específica con alta identidad y un mismo espacio ecológico.
- Los anaerobios estrictos no patogénicos en el tracto gastrointestinal de mamíferos forman un entorno de gran plasticidad genética que constituyen una reserva activa de determinantes de resistencia a los antibióticos y promueven su diseminación por transferencia génica horizontal.

Parte V

Apéndices

Apéndice A.

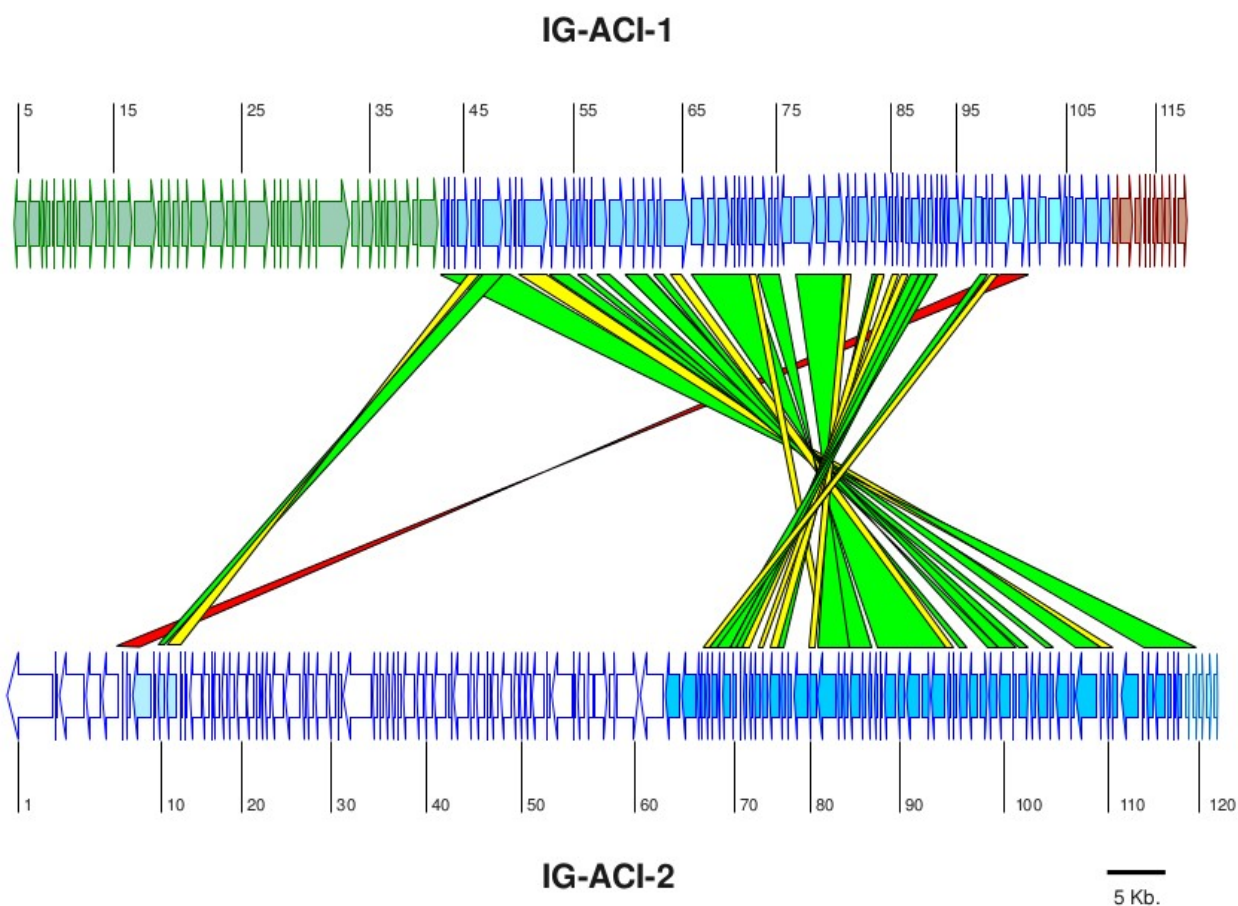


Figura A1.- Comparación a nivel nucleotídico entre el elemento IG-ACI-1 e IG-ACI-2. Se señalan las identidades mayores del 80%. En verde se representan los *orf* que tienen identidad a lo largo de toda su secuencia codificante. En amarillo se señalan los *orf* que tienen identidades parciales (no hay identidad a lo largo de la secuencia completa del *orf*). En rojo se indica un *orf* con una mínima identidad a lo largo de su secuencia, pero cuya posición es significativa.

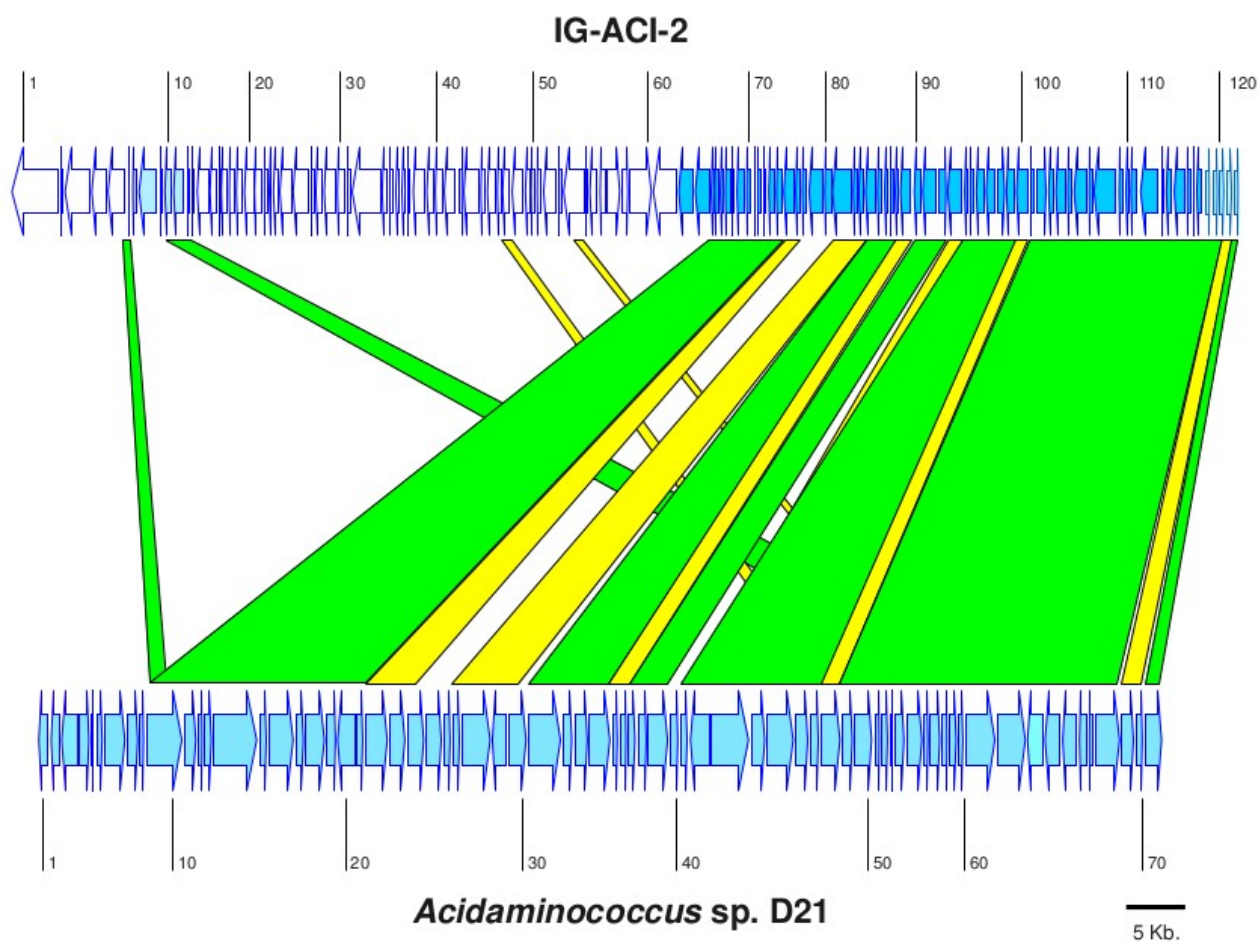


Figura A2.- Comparación a nivel nucleotídico entre el elemento IG-ACI-2 y el elemento en *Acidaminococcus sp.* D21. Se señalan las identidades mayores del 80%. En verde se representan los *orf* que tienen identidad a lo largo de toda su secuencia codificante. En amarillo se señalan los *orf* que tienen identidades parciales (no hay identidad a lo largo de la secuencia completa del *orf*).

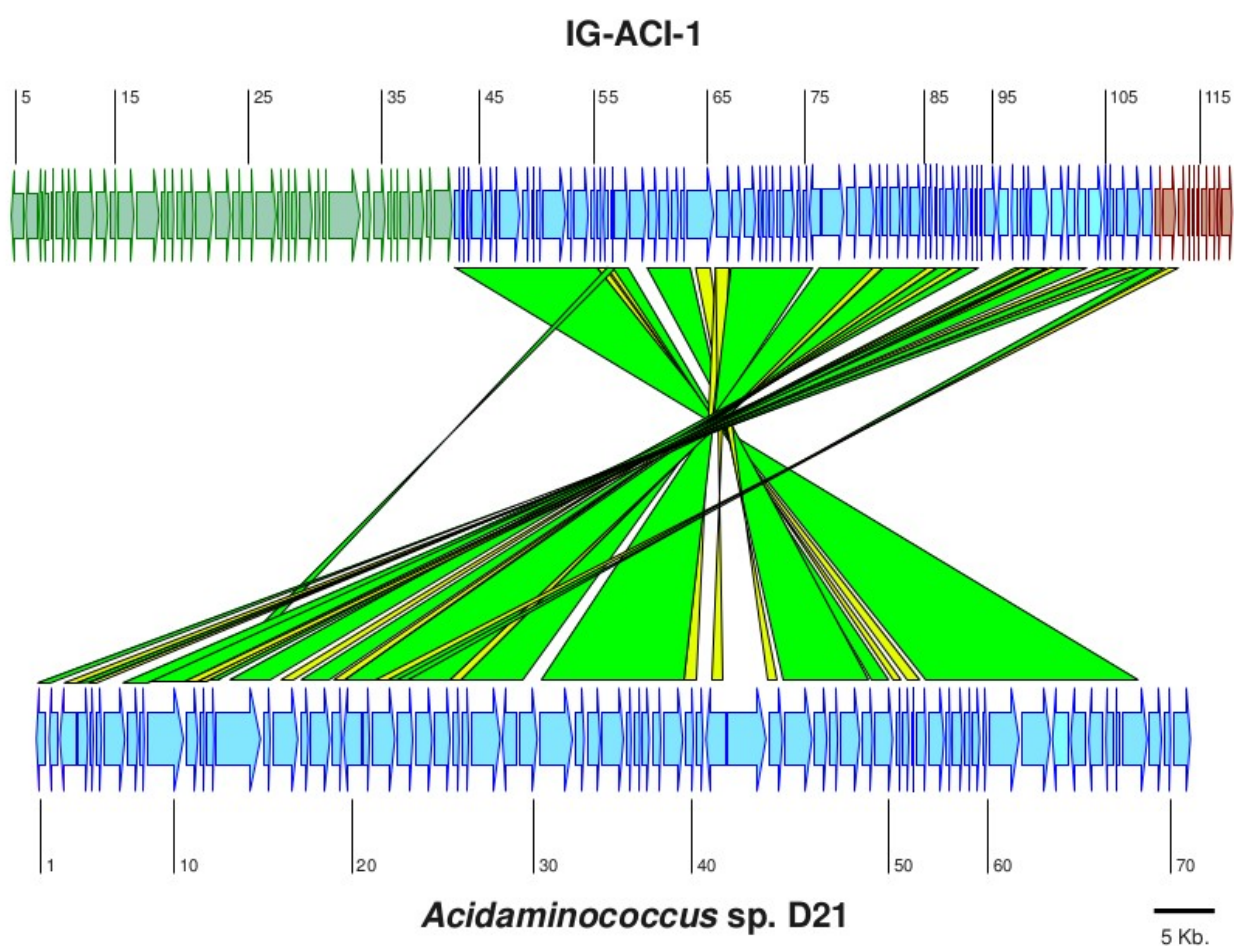


Figura A3.- Comparación a nivel aminoacídico entre el elemento IG-ACI-1 y el elemento en *Acidaminococcus* sp. D21. Se señalan las identidades mayores del 24%. En verde se representan los *orf* que tienen identidad a lo largo de toda su secuencia codificante. En amarillo se señalan los *orf* que tienen identidades parciales (no hay identidad a lo largo de la secuencia completa del *orf*).

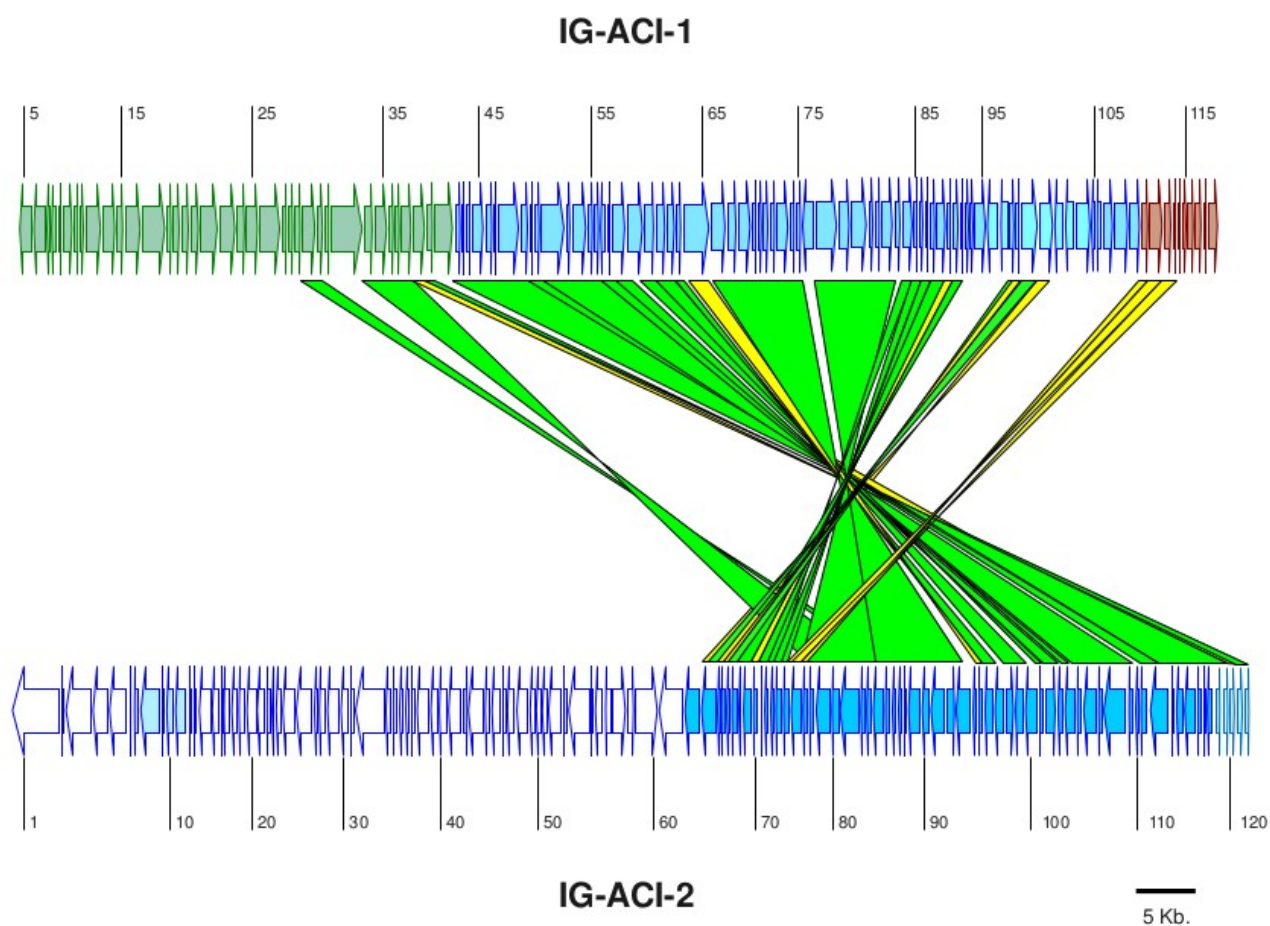


Figura A4.- Comparación a nivel aminoacídico entre el elemento IG-ACI-1 y el elemento IG-ACI-2. Se señalan las identidades mayores del 24%. En verde se representan los *orf* que tienen identidad a lo largo de toda su secuencia codificante. En amarillo se señalan los *orf* que tienen identidades parciales (no hay identidad a lo largo de la secuencia completa del *orf*).

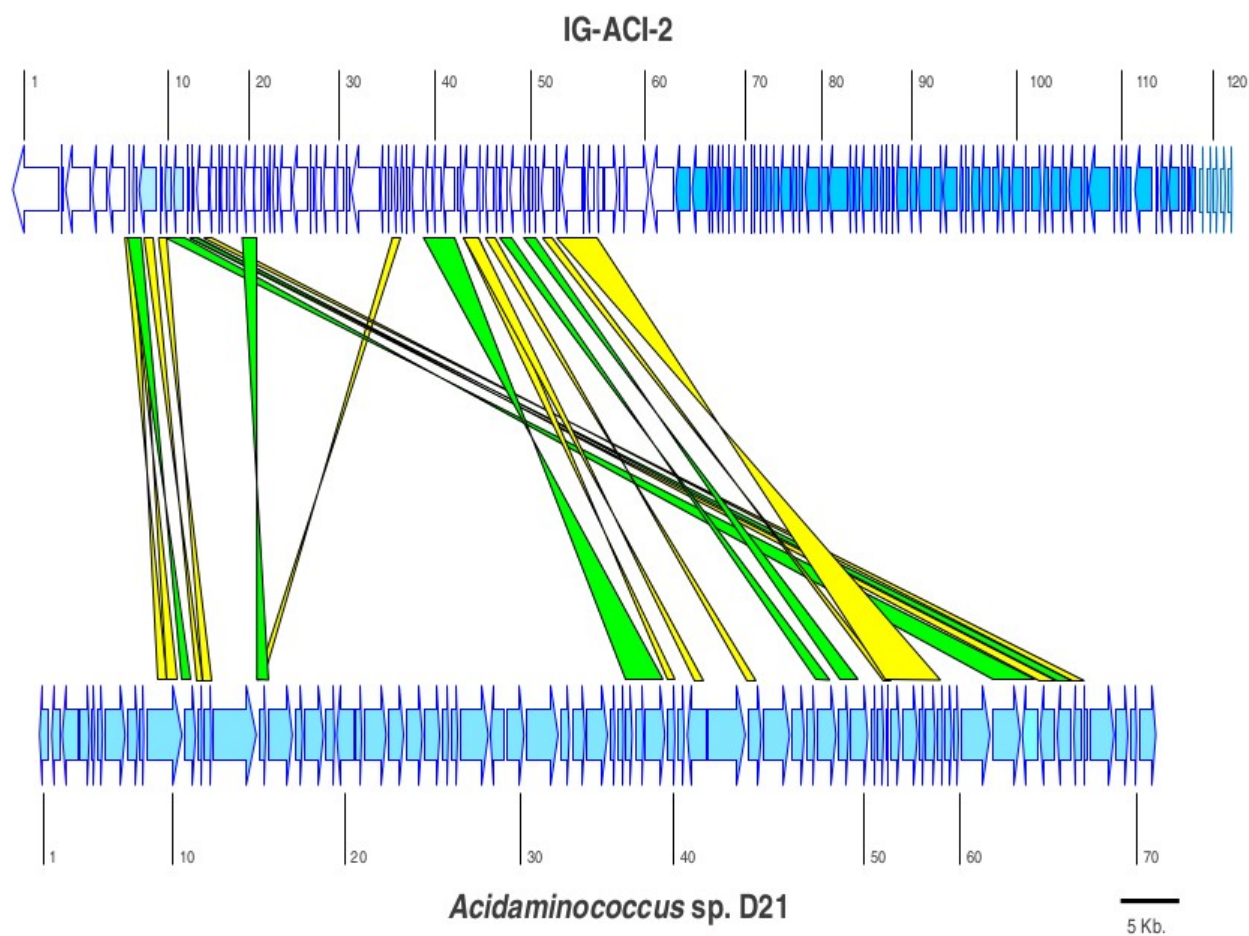


Figura A5.- Comparación a nivel aminoacídico entre el elemento IG-ACI-2 y el elemento en *Acidaminococcus sp.* D21. Se señalan las identidades mayores del 24%. En verde se representan los *orf* que tienen identidad a lo largo de toda su secuencia codificante. En amarillo se señalan los *orf* que tienen identidades parciales (no hay identidad a lo largo de la secuencia completa del *orf*).

Apéndice B.

IG-ACI-2

(*Acidaminococcus intestini* RYC-MR95)

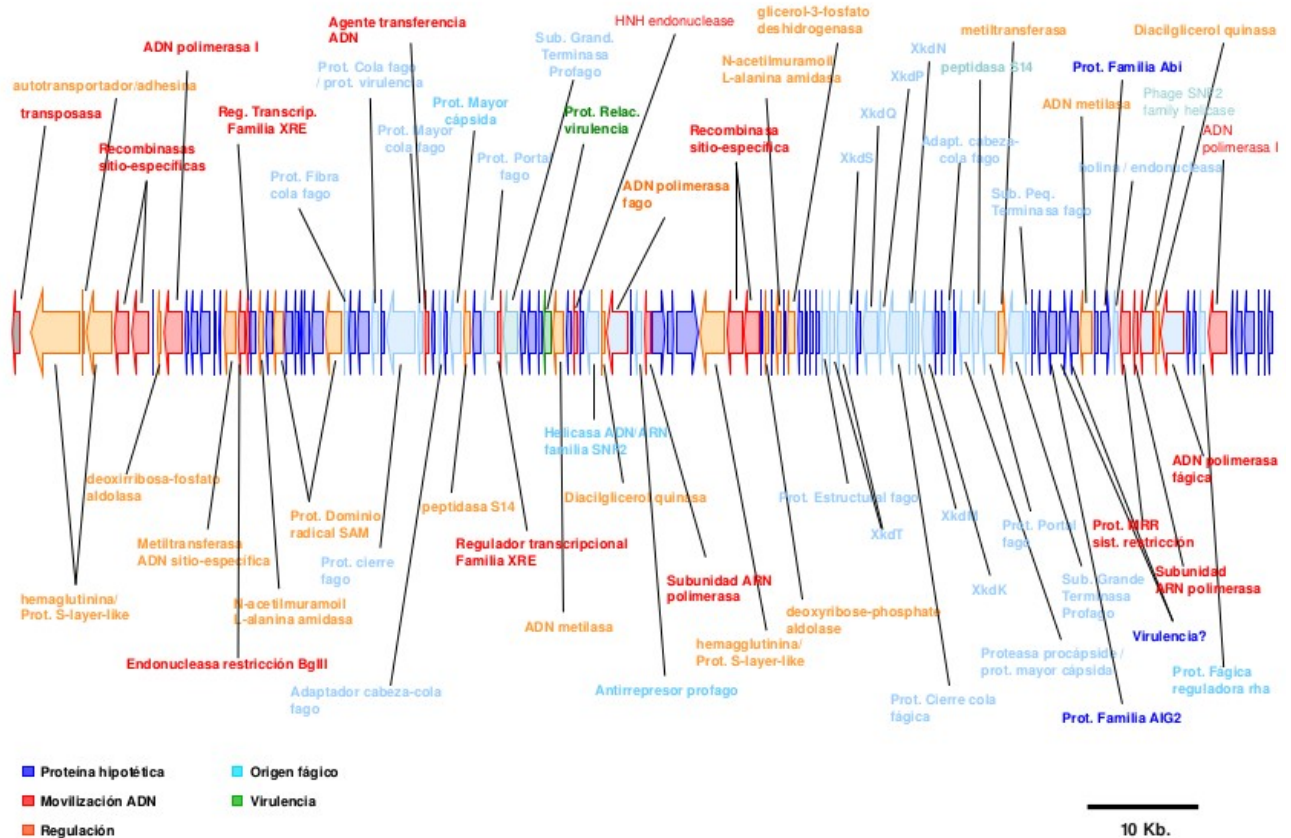


Figura B1.- Estructura del elemento IG-ACI-2. Se indican los diferentes *orf* identificados tras el proceso de anotación, clasificados por colores según su función hipotética o procedencia.

***Acidaminococcus* sp. D21**

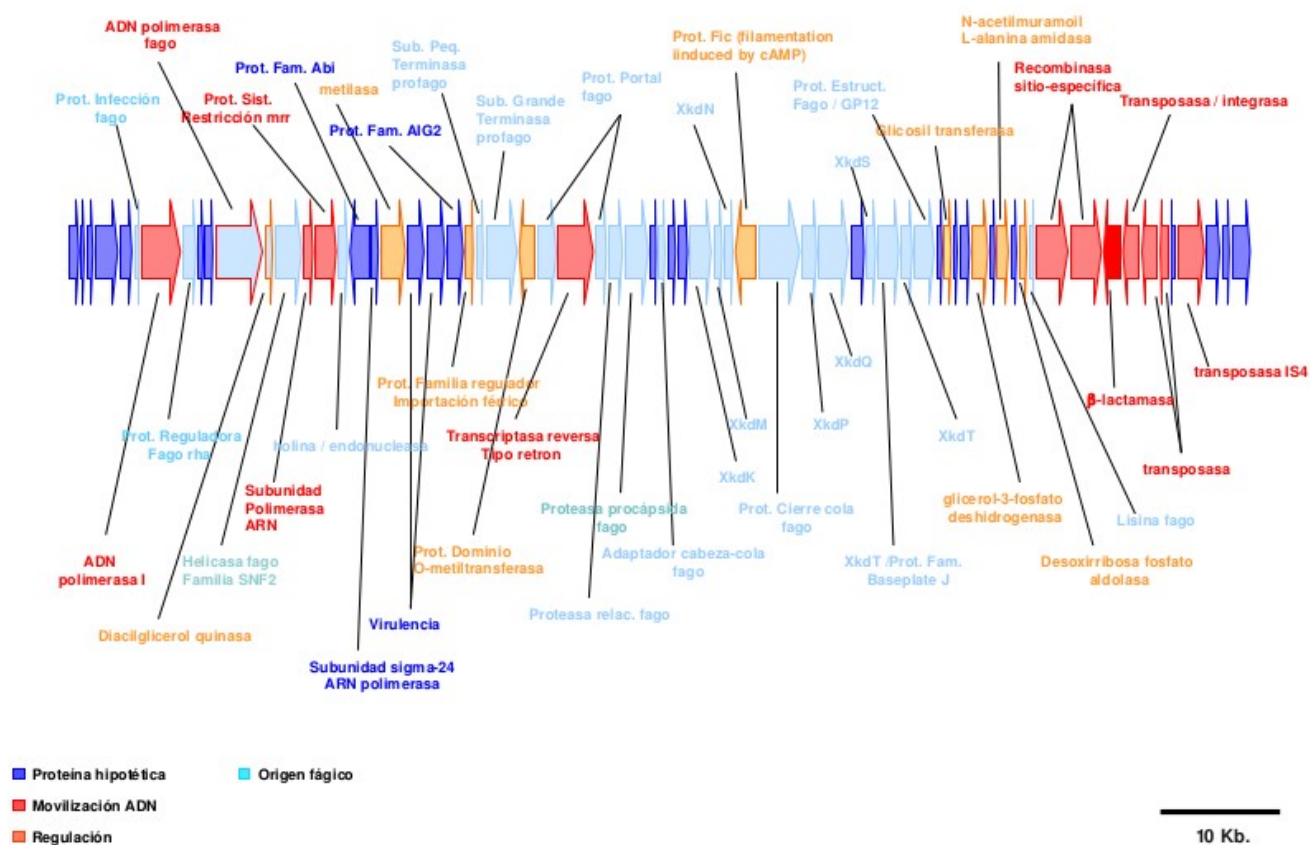


Figura B2.- Estructura del elemento encontrado en *Acidaminococcus* sp. D21. Se indican los diferentes *orf* identificados tras el proceso de anotación, clasificados por colores según su función hipotética o procedencia.